

ポリビニルアルコール (PVA) ゲルビーズ流動床による パラニトロフェノール含有廃水の処理

川 越 保 徳* 福 田 淳** 高 橋 弘 和***
藤 本 綾**** 南 直 哉**** 古 川 憲 治*

Treatment of *p*-nitrophenol-containing Wastewater Using Fluidized Bed Reactor with Polyvinyl Alcohol (PVA) Gel Beads

Yasunori KAWAGOSHI*, Jun FUKUDA**, Hirokazu TAKAHASHI***
Aya FUJIMOTO****, Naoya MINAMI* and Kenji FURUKAWA*

* Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1, Kurokami, Kumamoto 860-8555, Japan

** Maeda Corporation, 10-26, Fujimi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8151, Japan

*** Ataka Construction & Engineering Co., Ltd., 2-1-9, Nishi-ku Urihori, Osaka 550-0012, Japan

**** Faculty of Engineering, Kumamoto University, 2-39-1, Kurokami, Kumamoto 860-8555, Japan

Abstract

A fluidized bed reactor with polyvinyl alcohol (PVA) gel beads as a biomass carrier was used for the degradation of *p*-nitrophenol (PNP) in an artificial wastewater. PNP ($200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) was completely degraded at a hydraulic retention time (HRT) of 6 hours in the presence of $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ glucose. However, PNP degradation became unstable at $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ PNP and did not recover, which suggests that the decrease in the activity of PNP-degrading bacteria is due to the presence of glucose. On the other hand, when only PNP was supplied to the reactor, PNP ($360 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) was almost completely degraded at an HRT of 6 hours, and the PNP removal rates per volume and total solids (TS) were determined as $54 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and $12.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. From the PCR-DGGE result, two bacterial DNA sequences similar to those of *Acidovorax* and *Arthrobacter*, which are known for their PNP degrading ability, were determined in the biomass attached to the PVA gel beads; thus, we conclude that these bacteria mainly contribute to the PNP-degrading activity in the reactor.

Key words: *p*-nitrophenol, polyvinyl alcohol gel beads, biodegradation, wastewater treatment, *p*-nitrophenol-degrading bacteria

1. はじめに

ニトロフェノールやニトロベンゼンなどの含ニトロ基芳香族化合物は、医薬、農薬をはじめとする種々の化学製品の原料に用いられており、水環境中での検出が報告されている¹⁻⁶⁾。中でも、2-ニトロフェノールやパラニトロフェノール (PNP) は、我が国においても農薬や染料の原料、中間体として生産され⁷⁾、沿岸海域の表層水にて2-ニトロフェノールの検出事例がある⁸⁾。PNPは皮革防かび剤や農薬原料としての用途からも明らかな様に、動植物への毒性を有し、肝臓、腎臓、生殖器系への影響があるとされ、また *in vivo* では陰性とされているものの、変異原性や遺伝毒性についてDNA修復試験及び染色体異常試験で陽性の報告がある^{9,10)}。

化学工場排水等に含まれるPNPは活性汚泥法等の通常の水処理では分解されず、水環境中に排出されることになる。河川等の表流水での検出事例は少なく、また生体蓄積性も低いことから、好気性水環境での影響は即座に危惧されると考え難いが、PNPの水圏生物への毒性強度

は高く^{10,11)}、地下水に流入した場合には長期間の残存も想定される。

PNPの生分解については、*Pseudomonas*属や*Comamonas*属等の好気性細菌による生物分解が知られ、代謝経路や動力学的知見に関して知見が蓄積されている^{5,12-16)}。一方、PNPを含む排水処理等、処理対策技術に関する研究例は少なく、特に実用的見地からの連続処理に関する知見は乏しい¹⁷⁻¹⁹⁾。そこで筆者らの研究室ではPNPの連続分解処理に関して、不織布を生物付着担体として用いた固定床型リアクターによるPNPの連続分解処理を検討し、 $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ のPNPを処理可能であることを明らかにした²⁰⁾。しかしながら、本方法では水理学的滞留時間で11時間を必要とすることや、流動床によるPNP分解で報告されている値に比べて単位バイオマス当たりのPNP分解率が低い等の課題があり、その原因が微生物への酸素供給速度の限界によるものと推定された。そこで本研究では、高い酸素供給能力が期待できる多孔質担体であるポリビニルアルコール (PVA) ゲルビーズを用いた好気性流動床によるPNP分解処理を検討した。はじめにPNP以外の共炭素源としてグル

* 熊本大学大学院自然科学研究科 〒860-8555 熊本市黒髪2丁目39-1

** 前田建設(株) 〒102-8151 東京都千代田区富士見2丁目10-26

*** アタカ工業(株) 〒550-0012 大阪市西区立売堀2丁目1番9号

**** 熊本大学工学部 〒860-8555 熊本市黒髪2丁目39-1

コースを添加し、PNP分解細菌の馴養と集積を行った後にPNPを単一炭素源としてPVAゲルビーズ流動床による分解処理実験を実施した。また、PVAゲルビーズ付着汚泥、および流動床内の懸濁微生物に関して細菌叢解析を行い、PNP分解関与細菌に関する知見を得たので報告する。

2. 実験材料および方法

2.1 PNP馴養汚泥付着PVAゲルビーズの調製

本研究ではPVAゲルビーズとして(株)クラレ製のクラゲール(平均粒径:4mm、比重:1.03)を用い、種汚泥には、好気条件下でfill and draw法にて馴養した下水処理場活性汚泥を用いた。種汚泥をPVAゲルビーズとともに $500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ のグルコースと $10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ のPNPを含む基礎合成下水($20\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $63\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NaHCO_3 , $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ K_2HPO_4 , $25\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 , $42\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ CaCl_2 , $42\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl , $30\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl , $30\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH7.0)に投入し、さらに好気条件下でfill and draw法により汚泥のPNPへの馴養、およびPVAゲルビーズへの付着固定化を行った。この間、合成下水を入れ替える際にPNP濃度とTOCを測定した。約2ヶ月間の馴養後にPNPは安定して分解されPVAゲルビーズへの汚泥付着が確認されたことから、これをPNP馴養汚泥付着PVAゲルビーズとして以降の実験に供した。

2.2 実験装置

Fig. 1に実験装置の概要を示す。装置はPVAゲルビーズ流動床と沈殿槽からなり、流動床は塩化ビニル製で、容積は10l ($150\times 100\times 750\text{ mm}$)である。床内中央部に仕切板を取り付けて区分けし、仕切板の上下部分で水が往来できる構造とした。流動床排水口にはビーズセパレータを設置してゲルビーズの流出を防いだ。また、流動床の後段に、容量1.5l、表面積約 180cm^2 の沈殿池を設けて流出懸濁物(汚泥)を捕集し、分析に供した。

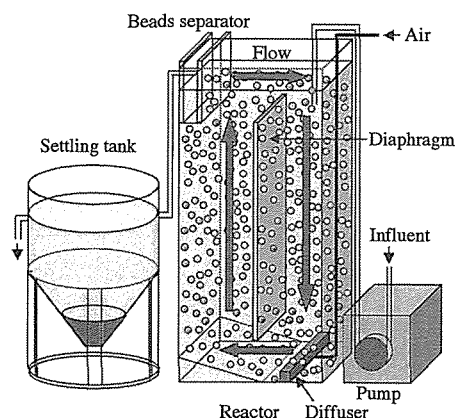


Fig. 1 Schematic diagram of PVA gel-beads fluidized bed reactor system

2.3 PVAゲルビーズ流動床によるPNPの分解

流動床には、上記のPNP馴養汚泥付着PVAゲルビーズを体積比で10%になるように充填した。Fig. 1に示すように、エアーポンプにて $5\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ で曝気するとともに槽内で旋回流を作り、ゲルビーズを循環流動させた。これにより、流動床内液中の溶存酸素濃度はほぼ飽和濃度レベルで維持される。PNPの分解実験は、PNPとグルコースの2種類の炭素源を共存させた場合とPNPを単一炭素源とした場合について行った。はじめに、易分解性の共

炭素源としてグルコースを添加し、PNPの分解処理を検討した。実験開始時のグルコースおよびPNPの濃度は種汚泥の馴養時と同じく $500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で合成下水を調製、供給し、その後2日以上に渡るPNPの分解を確認しながら段階的にグルコース濃度を減少させた。同様にPNPの分解を確認しながら段階的に濃度を上げた。ここで得られた流動槽内のゲルビーズは、PNPを単一炭素源とするPNP分解除去実験に供された。ゲルビーズの充填率、曝気条件等は変更せず、合成下水中の炭素源をPNPのみにしてPNP濃度 $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で実験を開始した。その後、PNPの分解を確認しながらPNP濃度を段階的に増加させた。全実験期間を通じて、流動床での水理学的滞留時間(HRT)は6時間、温度は 32°C とし、流入及び流出水中のPNP濃度、溶存態有機物濃度(TOC)、流動槽内汚泥(懸濁物濃度:MLSS)、PVAゲルビーズ付着汚泥量を経時的に測定した。また、全実験終了時の流動床内SSおよびPVAゲルビーズを採取し、PCR-DGGE法による細菌叢解析を行った。

2.4 分析方法

流入及び流出水中のTOC濃度は、TOCメーター(Shimadzu Co., Model TOC-5050A)で測定した。PNP濃度は、pH7.4に調整した試料の吸光度(401nm)を測定し、検量線から算出した²⁰⁾。PVAゲルビーズ付着汚泥の測定は、Fluorescein Diacetate (FD)法²¹⁾に準じ、以下の方法で行った。20個のPVAゲルビーズを50mlのリン酸緩衝液(60mM, pH7.6)に入れ、超音波発振器(Nissei Co., Model US150T)にて150Wで2分間処理して付着汚泥を剥離、懸濁させた。この懸濁液に、1mlのfluorescein diacetateのアセトン溶液($2\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)を添加し、 21°C の恒温下で1時間振盪(90rpm)後、さらに50mlのアセトンを加えて遠心分離して得られた上澄液の吸光度(490nm)を測定した。一方で流動床内のMLSSについても同様の方法で処理してMLSSと吸光度との検量線を作成し、これを基にゲルビーズ付着汚泥量を算出した。流動床でのTOC除去濃度およびPNP分解濃度は各々流入水中濃度と流出水中濃度の差として求め、TOC除去率[%]、PNP分解率[%]は除去量、分解量を流入水中濃度で除して算出した。また単位汚泥当たりのPNP分解量を比PNP分解率 $[\text{mg}\cdot\text{PNP}\cdot\text{g}\cdot\text{solid}^{-1}]$ とし、 $(\text{PNP分解濃度}[\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]\times\text{流動床容量}[\text{l}]) / (\text{流動床内全汚泥濃度}[\text{g}\cdot\text{solid}])$ にて計算した。

2.5 PCR-DGGEによる細菌叢解析

DNAの抽出には、市販のDNA抽出キット(UltraClean Soil DNA Isolation kit, MO BIO)を用いた。4個のPVAゲルビーズ、および1.5mlの流動床内液を遠心分離($10,000\text{ g}\times 5\text{ min}$)して得られたMLSS(懸濁態汚泥)から、各々DNAを抽出した。PCRは、フォワードプライマーとしてGCクランプ配列を付加した真正細菌用の16S rDNA用ユニバーサルプライマーU341f-GC($5' - \text{CGCCGCGCGCGCGCGGGCGGGGCGCGGGGCACGGGGGCGCTACGGGAGGCAGCAG} - 3'$)とリバープライマーDS907R($5' - \text{CCCCGTCATTCCTTTGAGTTT} - 3'$)²²⁾を用い、V3可変領域を含む約600bpsのDNA断片を増幅した。PCR反応液は、 $36\mu\text{l}$ の滅菌精製水に $10\mu\text{l}$ のTaq & Go ready mix (Qiogene)と各々 $1\mu\text{l}$ の $25\mu\text{M}$ プライマー溶液にて調製し、サーマルサイクラー(アステック, Model PC708)を用いてHot-start²³⁾ & touchdown法²⁴⁾により以下の反応を行った: 95°C (denaturation: 5 min) $\rightarrow 80^\circ\text{C}$

(hold: $2\mu\text{l}$ の抽出DNAを添加) $\rightarrow 65^\circ\text{C}$ (annealing: 1 min) $\rightarrow 72^\circ\text{C}$ (elongation: 3 min) $\rightarrow 95^\circ\text{C}$ (denaturation: 1 min)、以降annealing 温度を1サイクル毎に 1°C づつ 55°C まで下げ、同条件でさらに10サイクル処理した。PCR産物は、アガロース電気泳動にて確認後、変性剤密度勾配ゲル電気泳動 (denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE) に供してDNA断片を分離した。DGGEゲルは、各DNAバンドが明確に区別できる変性剤濃度勾配を検討し、最終的に20~60%とした。電気泳動は恒温スラブゲル用電気泳動装置 (ATTO, Model AE-6290E) を用い、 60°C 恒温下で200V、6時間で行った。泳動終了後にゲルをSYBR GreenIで30分間染色してDNAバンドを確認、採取し、上記プライマーにて再度増幅後、DNA配列解析に供した。DNA配列解析は、DNAシーケンサー (CEQ8000, Beckman) にて行った。DGGEの手順、DNA配列解析等の一連の操作は文献等²⁵⁾を参照し、各関連機器の操作方法に準じて行った。得られたDNA配列はWeb上のデータベース「FASTA」及び「BLAST」²⁶⁾を利用して既知DNA配列との相同性を調べ、近縁細菌種を推定した。

2. 実験結果及び考察

3.1 グルコースを共存させた場合のPNP分解除去

PNPは約 $500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上の濃度で、PNP分解細菌の増殖阻害を示すことが知られている^{18,20)}。したがって低濃度のPNPであればPNP分解細菌の増殖も可能ではあるものの、まずはじめに易分解性の炭素源であるグルコースとPNPを共添加してPNP分解細菌量を高め、その後グルコース濃度を減少、PNP濃度を上昇させることでPVAゲルビーズへの付着固定化の促進およびPNP分解除去能の向上を図ることとした。Fig. 2に、流入水と処理水中のPNPおよびTOC濃度の経時変化、Fig. 3にPNP分解率 (中央のグラフ)、反応槽内の総汚泥量、PVA付着汚泥、および比PNP分解速度の経時変化を合わせて示す。グルコース濃度 $500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、PNP濃度 $10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と、PNPに対する汚泥の馴養時と同じ基質条件で開始したところ、24時間経過後には95%のPNP分解が認められ、その後3日間に渡って99%以上の安定したPNP分解率が得られた。また、TOC除去率も98%以上であったことから、本条件に適応できる十分なPNP資化性汚泥が確保されたものと判断し、グルコース濃度を $250\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に引き下げた。その後さらに約3日の馴養期間を経ながら流入グルコース濃度を $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $50\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と段階的に減じた。この間、Fig. 3にみられるように、リアクター内の総汚泥量 (TS) は緩やかな減少を示したものの、PNPおよびTOC除去率の顕著な低下は認められなかった (Fig. 2)。そこで、流入PNP濃度を引き続き段階的に引き上げたところ、PNP濃度 $80\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ まではPNPの分解、TOC除去ともに安定して良好な結果が得られていたが、 $160\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ では即座に処理液中PNP濃度とTOCが上昇した (Fig. 2 影部)。またこの時、総汚泥量も若干低下したが (Fig. 3 影部)、これは主に懸濁態汚泥 (SS) の低下によることからPNP濃度の急激な上昇による汚泥の生育阻害が推定された。そこでしばらく同条件を維持してPNP資化性汚泥の馴養を図ったところ、速やかに処理水中PNP濃度及びTOCは低下し、処理能の回復が認められた。その後一時的な総汚泥量の減少がみられたため10日間の間、同条件で運転を継続した。

これにより、総汚泥量は緩やかに増加し、PNP資化性汚泥の集積、優占化が推定された。その後、流入PNP濃度を $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に引き上げたが処理能は維持され総汚泥量の低下もみられなかった。

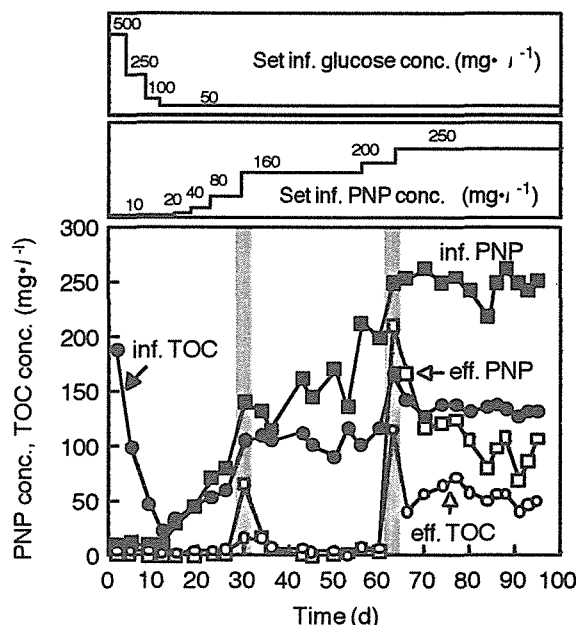


Fig. 2 Time course of PNP concentration and TOC in the reactor with glucose and PNP

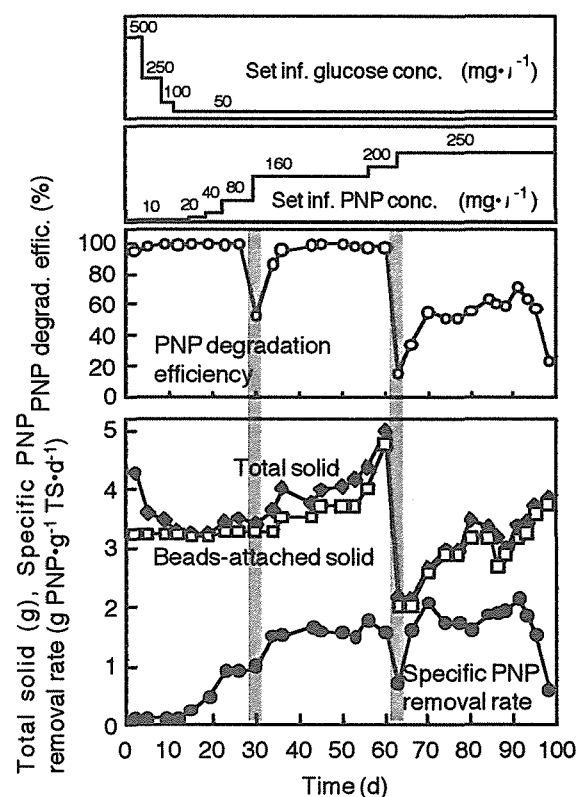


Fig. 3 Time course of PNP degradation and solid volume in the reactor with glucose and PNP

次にPNP濃度を $250\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ にしたところ、処理水中PNP濃度とTOCの急激な上昇 (Fig. 2 影付範囲) が認められ、PNP分解率は約20%にまで低下した。総汚泥量も急激に

低下 (Fig. 3 影付範囲) した。この時には懸濁態汚泥だけでなく PVA 付着汚泥も半減し、PNP による重篤な影響が推定された。その後約 1 ヶ月の間、同条件を維持することで総汚泥量は緩やかに回復したものの、PNP 分解率は約 50% 程度に低下したままであった。したがって、本条件下では PNP 資化性汚泥が流入 PNP 量の 50% にあたる約 $120\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の PNP を無機化可能な量まで集積されたに留まってしまったものと推定された。PNP の分解における共代謝基質の影響について、Shmidt らは PNP 分解細菌 *Pseudomonas* sp. K 株による PNP の分解に関し、共代謝物としてのグルコースの添加は細菌の増殖促進効果は有するものの PNP 分解活性に対しては影響せず、一方で Phenol 等を共代謝物とすることにより、PNP 分解細菌の増殖及び PNP 分解活性を向上させ得るとしている¹²⁾。また、Bhatti らも、馴養初期段階でのグルコース添加は PNP 資化性汚泥の集積に有効ながら、高濃度 PNP の分解能向上には抑制的であったことを示している²⁰⁾。PNP の様な有害物質の分解における共代謝物質の影響に関してはさらに詳細な検討が必要と考えられるが、本実験についてはグルコースの共存はさらなる PNP 分解活性の向上には有効ではないと判断し、PNP を単一炭素源として PNP 分解除去能の向上を図ることとした。

3.2 PNP を単一炭素源とした場合の PNP 分解除去

PNP とグルコースの共存条件下で馴養・集積された PVA ゲルビーズを用い、初期流入 PNP 濃度を $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ として、PNP を単一炭素源とした条件下で分解除去を検討した。Fig. 4 に流入水と処理水中の PNP および TOC 濃度の経時変化、Fig. 5 に PNP 除去率と汚泥量の経時変化を示す。Fig. 4 から明らかなように、運転開始 3 日後には、 $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の PNP は 99% 以上が分解され、TOC 除去率も 95% が得られた。そこで同条件での運転を 1 週間続けた後、PNP 濃度を約 2 日毎に段階的に引き上げ、PNP 及び TOC 除去能の変化を追跡した。その結果、PNP 濃度が $350\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ までは安定した処理能が得られ、リアクター内の汚泥量も増加することが明らかとなった。しかしながら、PNP 濃度を $400\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に上げた直後に急激な汚泥の減少と処理能の低下がみられ、PNP による汚泥の増殖阻害等の毒性影響が認められた。PNP による細菌の増殖阻害については、PNP 分解細菌 *Pseudomonas putida* PNP1 が $400\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の PNP 濃度下で約 20% の生育速度低下を示し、 $600\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で生育不可であることが報告されている¹⁹⁾他、Bhatti らは、不織布に付着した混合系 PNP 細菌群において、HRT が 3.5 時間の場合には $300\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の PNP 存在下で著しい PNP 分解率低下がみられたとしている²⁰⁾。これらの知見から、 $300\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上の PNP 濃度で PNP 分解細菌の増殖阻害が起こる可能性が推定された。そこで PNP 濃度を $300\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に引き下げ、汚泥の回復を図った。PNP 濃度を $300\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に設定してすぐに汚泥の増加 (Fig. 5) がみられ、PNP、TOC 除去率も回復したため、2 日後に濃度を $330\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に引き上げた。しかし、PNP 濃度を $360\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ にしたところ、1 日後に PNP と TOC 除去率および汚泥濃度の低下がみられた。ただし、汚泥濃度の低下は PNP 濃度を $400\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ にした時に比べて緩やかであったことから PNP 濃度を維持したまま様子を見た。その後、汚泥濃度は緩やかに低下し、約 $4\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ で推移した。PNP、TOC 除去率ともに回復し、最終的に 90% 以上の PNP 分解除去率が得られた。

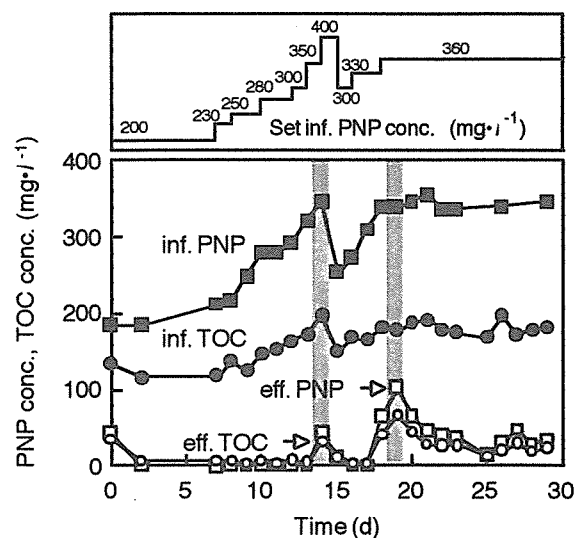


Fig. 4 Time course of PNP concentration and TOC in the reactor with PNP as a sole carbon source

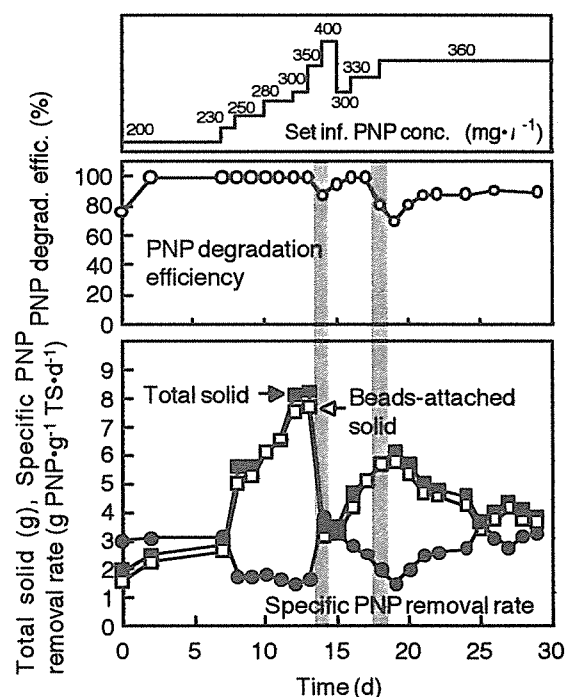


Fig. 5 Time course of PNP degradation and solid volume in the reactor with PNP as a sole carbon source

Bhatti らは生物学的 PNP 分解処理について、グルコースが共存した場合には $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の PNP を分解除去するのに 11 時間の HRT を必要としたのに対し、PNP 馴養汚泥による PNP 単独処理では HRT が 3.5 時間で $250\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、11 時間では $500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の PNP を分解除去できたとしている²⁰⁾。また Xing らはポリウレタン製の微生物担体を用いたリアクターを使用することで $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の PNP が 24 時間以内に分解され、担体が無い場合よりも PNP 分解速度が向上したとしている¹⁹⁾。Table 1 にリアクター容積及び単位汚泥重量当たりの最大 PNP 分解速度について、文献値等と比較した。流入 PNP 濃度は、Xing らの場合には高濃度の PNP 含有排水の分解除去を目的としたものではない

ため流入 PNP 濃度は低く、結果としてリアクター容積当たりの PNP 処理率は最も低くなったが、TS 当たりの PNP 処理率は、不織布を担体を用いた Bhatti らの結果よりも優れている。これは、PNP の分解においては不織布などの主に表面に厚い生物膜、あるいは生物塊を付着生成させる担体よりも、多孔質による広い表面積に比較的薄い生物膜が生成され、かつ生物膜への高い酸素供給能が得られる担体の方が有利であることを示しているものと考えられる。

微生物による有害物質の分解除去を考える場合には、一般に懸濁態微生物を用いるリアクターよりも固定化微生物を用いるリアクターが適しているとされる。これは、固定化微生物が生成する生物膜あるいは微生物塊がいわゆるバリアーとなり、有害物質の毒性影響を和らげる効果があること、また有害物質耐性がプラスミドのように細胞間で移動可能な遺伝子上にコードされている場合には、細胞同士の密着性が高い生物膜ではその移動が容易になり、結果として耐性獲得細胞の増加速度が早まること等がその理由として考えられる。不織布を用いた Bhatti らの研究においても、PNP 分解に対する生物膜の有効性が示されているが、さらに多孔質性の担体の場合には、担体表面から孔内奥部に至るまでに担体の層壁による有害物質の濃度勾配が生成され、内部の微生物への毒性が低減される効果が期待できる。Xing らも、多孔質担体に付着した微生物の PNP 活性は懸濁態微生物よりも2倍以上高いことを確認し、PNP の分解における多孔質担体の有効性を明らかにしている¹⁹⁾。

Table 1 Comparative data on PNP removal by immobilized biomass reactors

Reactor	This study	Bhatti et al. ²⁰⁾	Xing et al. ¹⁹⁾
Carrier	Continuous fluidized bed	Continuous fixed bed	Batch fluidized bed
Carrier	PVA gel beads	Nonwovens	Porous polyurethanes
Reactor volume (l)	10	5	4
Carrier volume percent (%)	10	15	20
Maximum PNP concentration (mg·l ⁻¹)	360	500	100
PNP removal rate (mg·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	54	67	8.3
PNP removal rate (mg·g-TS·h ⁻¹)	12.6	4.7	7.5

* Calculated from the data in paper

** Calculated from the result of 100 mg·l⁻¹ PNP removal for HRT 12 hours

PVA ゲルビーズを微生物付着担体を用いた排水処理の研究例では、PVA ゲルが有する優れた気体分子の浸透性と拡散性を利用して高い酸素供給量を必要とする高速・高負荷の好気性処理を目的としたものが多い²⁷⁻²⁹⁾。本研究においても、同じ多孔質担体を用いた Xing らの研究よりも高い PNP 分解速度 (単位 TS 当たり) が得られたが、これは担体内部への酸素供給速度の差異が影響している可能性がある。これについては PVA ゲルビーズを用いる他研究も含めて今後の検討課題としたい。

3.3 PVA ゲルビーズ付着生物膜及び SS の細菌叢解析

PCR-DGGE の結果を Fig. 6 に示す。PVA ゲルビーズ付着汚泥試料では4本、懸濁態汚泥では3本の明確な DNA バンドが見られ、その内、2本の DNA バンド (Fig. 6 上、4 と 5 の DNA バンド) については同じ位置にあった。いずれの試料においても、得られた DNA バンド数は少なかったが、これは炭素源が PNP のみで、かつその濃度が 360mg·l⁻¹ と細菌に対して毒性を発現するレベルであることから、生育、共存できる細菌の種類が限られたためと考えられ

る。これら計7本の DNA バンドの配列を調べた結果、No. 4 と No. 5 の配列が一致したため、最終的に5種類の DNA 配列について相同性検索を行い、Table 2 の結果が得られた。これらの DNA 配列の中で属レベルで同じである可能性が高いと判断される 97%以上の塩基配列相同性が得られたのは、No. 4 と No. 5 の DNA バンドであり、各々 *Acidovorax* sp. C1 (99.7%)、*Arthrobacter* sp. AD25 (99.6%) となった。

これまでに PNP 分解能が知られている細菌には、*Pseudomonas* 属^{12, 15, 18)}、*Comamonas* 属¹⁶⁾、*Moraxella* 属¹³⁾ 等がある。今回、PVAゲルビーズから抽出・増幅された DNA バンドで最も相対的濃度が高いNo. 4は*Acidovorax*属の細菌であり、*Acidovorax*属については、ニトロフェノールやフェノール分解能を有するものが知られている¹⁶⁾。さらに、No. 5のDNAバンド塩基配列と高い相同性が得られた *Arthrobacter* 属についても PNP 分解能を有する細菌が見出されている¹⁴⁾。これらの結果から、本リアクタにおいては、これら *Acidovorax* 属および *Arthrobacter* 属の細菌が PVAゲルビーズ付着汚泥中で優占しており、PNPの分解に寄与しているものと推定された。

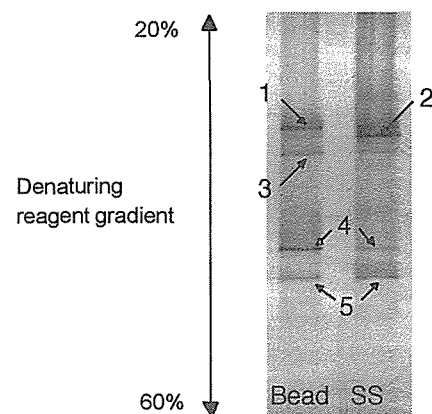


Fig. 6 DGGE results of PVA-attached biomass and suspended (planktonic) biomass

Table 2 Bacteria closely related to DNA sequence of bands on DGGE

Band no.	Closest relative	% Similarity	Acces. no.
1	<i>Cytophaga</i> sp. D2	92.1	AF250407
2	<i>Flexibacter</i> sp. CF-1	94.4	AF361187
3	Unclassified <i>Sphingobacteriales</i> bacterium CS57	93.6	AY124340
4	<i>Acidovorax</i> sp. C1	99.7	AJ457191
5	<i>Arthrobacter</i> sp. AD25	99.6	AY628691

4. まとめ

PVA ゲルビーズ流動床による PNP 分解処理方法の確立を目的に処理性能の検討、および細菌叢解析を行い、以下の知見が得られた。

1) グルコースを共役炭素源としてリアクタに常時添加した上で PNP の分解除去を検討した結果、グルコース 50mg·l⁻¹ の条件下で、200mg·l⁻¹ までの PNP を HRT 6 時間で分解処理可能であった。しかし、グルコースの影響と考えられる PNP 分解能の抑制が示唆された。

2) PNP を単一炭素源とした場合には、360mg·l⁻¹ の PNP を HRT 6 時間で安定して分解処理可能であることが分か

った。

3) PVAゲルビーズに付着した細菌叢については、PNP分解能が知られている*Acidovorax*属細菌が優占している可能性、同じくPNP分解能が報告されている*Arthrobacter*属の細菌の存在が示され、これらが本流動床でのPNP分解に大きく貢献しているものと推定された。

(原稿受付 2006年2月16日)

(原稿受理 2006年7月12日)

参考文献

- Spain, J. C., Pritchard, P. H. and Bourquin, A. W. (1980) Effects of Adaptation on Biodegradation Rates in Sediment/Water Cores from Estuarine and Freshwater Environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 726-734.
- Spain, J. C., Van Veld, P. A., Monti, C. A., Pritchard, P. H. and Cripe, C. R. (1984) Comparison of p-Nitrophenol Biodegradation in Field and Laboratory Test Systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 944-950.
- Wiggins, B. A., Jones, S. H. and Alexander, M. (1987) Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 791-796.
- Wiggins, B. A. and Alexander, M. (1988) Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2803-2807.
- Nishino, S. F. and Spain, J. C. (1993) Cell density-dependent adaptation of *Pseudomonas putida* to biodegradation of p-nitrophenol, *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 489-494.
- Laha, S. and Petrova, K. P. (1997) Biodegradation of 4-nitrophenol by indigenous microbial populations in Everglades soils, *Biodegradation*, **8**, 349-356.
- 化学工業日報社 (2003) 14303の化学商品, 化学工業日報社, 東京.
- 門上希和夫, 陣矢大助, 岩村幸美, 谷崎定二 (1998) 北九州市沿岸海域の化学物質汚染とその由来, *環境化学*, **8**, 435-453.
- Shimizu, M. and Yano, E. (1986) Mutagenicity of mono-nitrobenzene derivatives in the Ames test and rec assay, *Mutat. Res.*, **170**, 11-22.
- Zaidanhoujin, Kagakubussitu, and Hyoukakenkyuukikou (2002) Kagakubussitu Anzensei Hyouka sheet (p-nitrophenol), http://www.cerij.or.jp/cerij_jp/koukai/date_sheet_list/list_number.html
- 環境省環境保健部環境リスク評価室 (2004) 化学物質の環境リスク評価 (第3巻) p-ニトロフェノール, <http://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/>
- Schmidt, S. K., Scow, K. M. and Alexander, M. (1987) Kinetics of p-nitrophenol mineralization by a *Pseudomonas* sp.: effects of second substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2617-2623.
- Spain, J. C. and Gibson, D. T. (1991) Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 812-819.
- Jain, R. K., Dreisbach, J. H., Spain, J. C., Hanne, L. F., Kirk, L. L., Appel, S. M., Narayan, A. D. and Bains, K. K. (1994) Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3030-3032.
- Loser, C., Attoubelli, M. and Hertel, T. (1998) Growth kinetics of the 4-nitrophenol degrading strain *Pseudomonas putida* PNP1, *Acta Biotechnology*, **18**, 29-41.
- Zhao, J. S. and Ward, O. P. (1999) Microbial degradation of nitrobenzene and mono-nitrophenol by bacteria enriched from municipal activated sludge, *Can. J. Microbiol.*, **45**, 427-432.
- Heitkamp, M. A., Camel, V., Reuter, T. J. and Adams, W. J. (1990) Biodegradation of p-nitrophenol in an aqueous waste stream by immobilized bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2967-2973.
- Ray, P., Ait Oubelli, M. and Loser, C. (1999) Aerobic 4-nitrophenol degradation by microorganisms fixed in a continuously working aerated solid-bed reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 284-290.
- Xing, X.-H., Inoue, T., Tanji, Y. and Unno, H. (1999) Enhanced microbial adaptation to p-Nitrophenol using activated sludge retained in porous carrier particles and simultaneous removal of nitrite released from degradation of p-Nitrophenol, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 372-377.
- Bhatti, Z. I., Toda, H. and Furukawa, K. (2002) p-Nitrophenol degradation by activated sludge attached on nonwovens, *Water Res.*, **36**, 1135-1142.
- Prieto, B., Silva, B. and Lantes, O. (2004) Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods, *Sci. Total. Environ.*, **333**, 1-7.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J. Bacteriol.*, **173**, 697-703.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D., Raymond, J. and Bloch, W. (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications, *Nucl. Acids Res.*, **20**, 1717-1723.
- Don, R., Cox, P., Wainwright, B., Baker, K. and Mattick, J. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification, *Nucl. Acids Res.*, **19**, 4008.
- 石井浩介, 中川達功, 福井 学 (2000) 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用, *日本微生物生態学会誌*, **15**, 59-73.
- Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2444-2448.
- Lin, Y.-F. and Chen, K.-C. (1995) Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system, *Water Res.*, **29**, 35-43.
- Chen, K.-C., Chen, S.-J. and Hough, J.-Y. (1996) Improvement of gas permeability of denitrifying PVA gel beads, *Enzyme Microbial Technol.*, **18**, 502-506.
- Jianlong, W., Xiangchun, Q., Liping, H., Yi, Q. and Hegemann, W. (2002) Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of *Burkholderia pickettii*, *Water Res.*, **36**, 2288-2296.