生分解性プラスチックPHBを活用する 硝酸性窒素で汚染された地下水の脱窒

Denitrification of Groundwater Using Biodegradable Plastic Poly- β -Hydroxybutyrate

金 虎¹、浦上貞治²、古川憲治³

¹熊本大学大学院自然科学研究科／〒860-8555 熊本市黒髪2-39-1

²三菱ガス化学(株)生物化学部／〒100-8324 東京都千代田区丸の内2-5-2

³熊本大学工学部環境システム工学科／〒860-8555 熊本市黒髪2-39-1

HU JIN¹, TEIZI URAKAMI², and KENJI FURUKAWA

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

²Biochemical Division, Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc
/2-5-2, Marunouchi, Tiyoda-ku, Tokyo 100-8324, Japan

³Department of Civil Engineering & Architecture, Kumamoto University
/2-39-1, Kurokami, Kumamoto city, 860-8555, Japan

Abstract

The addition of a hydrogen donor is essential for heterotrophic biological denitrification treatment. Experiments were conducted on the denitrification treatment of groundwater using biodegradable plastic poly- β -hydroxybutyrate (PHB). Batch denitrification tests using denitrifying activated sludge and continuous treatment using a soil column were carried out. Results showed that denitrifying activity improved with time and that the surface of PHB pellets changed unevenly in the batch tests. The soil column with PHB could remove influent $\text{NO}_3\text{-N}$ completely, but the soil column without PHB could not remove influent $\text{NO}_3\text{-N}$ at all. Effluent TOC concentrations from the soil column, in which 342g of PHB pellets were buried, were high (max:38mg-TOC/l), but effluent TOC concentrations from soil columns in which 171 and 86 of g-PHB pellets were low.

Key Words: biodegradable plastic, PHB, denitrification, groundwater, contamination

1. はじめに

1970年代に入り、欧米先進国を中心にした拡大した硝酸性窒素（以下、 $\text{NO}_3\text{-N}$ と略する）による地下水汚染は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の過剰な摂取が幼児にとってはメトヘモグロビン血症の原因となることから、日本でも大きな社会問題となつて久しい。1982年度に環境庁により実施された地下水汚染調査の中で、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は最も検出率の高かった物質であり、10%の試料で水道水質基準を超過していた。さらに、全国の地下水起源の水道原水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は、

浅井戸及び深井戸のいずれについても経年的に上昇傾向にあり、全国各地で徐々に地下水汚染が進みつつあることを示している¹⁾。

硝酸汚染の要因には、生活排水、工場排水の地下浸透、畜産廃棄物の土壌浸透や農地施肥などが挙げられているが、その中で農地施肥が主たる要因と考えられている。国包らが試算したように、わが国の土壌に負荷される窒素量に占める割合は化学肥料が約60%にも上る²⁾。1995～96年度に熊本県が地下水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 汚染の原因について考察した結果、汚染は化学肥料の溶脱に起因すると考

えられ、特に畑作物への施肥の影響が大きいものと推察している³⁾。

$\text{NO}_3\text{-N}$ の人の健康への影響としてメトヘモグロビン血症(チアノーゼ、窒息症状)が知られている。飲料水などに多量の $\text{NO}_3\text{-N}$ が含まれていると、その一部は消化器系内の微生物によって還元されて亜硝酸塩となる。吸収された亜硝酸塩は、さらに血中のヘモグロビンと結合してメトヘモグロビンになるが、このメトヘモグロビン濃度が血中で10%を上回ると、細胞への酸素供給が不十分となり、チアノーゼ症状を呈するメトヘモグロビン血症の原因となる。特に乳幼児の胃腸内は酸度が弱いため、微生物による $\text{NO}_3\text{-N}$ 還元が起きやすく、メトヘモグロビン血症にかかりやすいとされている⁴⁾。この理由により、日本の飲料水は硝酸性窒素と亜硝酸性窒素の総量として10mgN/lの水質基準が設けられている。今後も、世界的に地下水の $\text{NO}_3\text{-N}$ 汚染が進むことが予想され、早急な対策が求められている。

現在、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の除去方法としては、イオン交換、逆浸透、電気透析などの物理化学的方法と、微生物の $\text{NO}_3\text{-N}$ を窒素ガスに還元除去する能力を利用した生物学的脱窒法が考えられる。生物学的脱窒法は、脱窒菌の働きを利用して水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ を窒素ガスに還元する方法である。 $\text{NO}_3\text{-N}$ は溶存酸素の存在しない嫌気条件(anoxic condition)下で水素供与体が存在すると、脱窒菌の働きで窒素ガスに還元除去される。自然界に広く分布する脱窒菌は一般に従属栄養の通性嫌気性菌で、嫌気条件下で $\text{NO}_3\text{-N}$ あるいは $\text{NO}_2\text{-N}$ を還元する際に水素供与体としての有機炭素源を要求する。脱窒処理の有機炭素源としてはエタノール、メタノール、酢酸、澱粉、グルコース等が利用されている。

生物学的脱窒反応を活用する地下水の脱窒処理では $\text{NO}_3\text{-N}$ に汚染された地下水をポンプで地上に汲み上げて、エタノールなどの炭素源を補填した後、脱窒リアクターで脱窒反応を行うが、次のような問題が残されている。

- ① 脱窒処理施設が必要で、プラントの建設費などに莫大なコストが必要となる。
- ② 薬品コストがかかる。
- ③ 大量の脱窒活性汚泥を準備しなければいけない。
- ④ 運転を誤ると中間代謝物として有毒な $\text{NO}_2\text{-N}$ が形成される。

脱窒の炭素源として加えられる水溶性の有機物は地下水の流れによって拡散し、脱窒能の効果持続時間が短くなることに加え、脱窒に利用されなかった成分の流出に伴って二次汚染が生じる恐れがある。生分解性プラスチ

ックのような微生物によって徐々に分解される固体物質を脱窒の炭素源として利用することができれば、長期間炭素源を供給することなく脱窒処理できる可能性がある。また、生分解性プラスチックを活用する地下水の脱窒処理では水溶性の有機物のように連続して供給するための設備が必要ないため、薬品と設備のコストが低くなる。

我々は脱窒の炭素源として生分解性プラスチックであるPoly- β -Hydroxy Butyrate(PHB)に注目した。PHBは非水溶性で成型体を得る事が可能であり、これを汚染された地下水層中に埋め込むことで、土壤中の脱窒菌によって地下水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ が窒素ガスに還元除去できるかどうか検討した。本研究では地下水脱窒の水素供与体としてのPHBの有用性を明らかにする目的で、脱窒活性汚泥を用いた回分試験とPHBを埋め込んだ土壌カラムを用いた連続試験により検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 実験材料

1) PHB

PHBは微生物によって生産される熱可塑性の天然高分子化合物であり、近年自然界で土壌や水中の微生物により H_2O と CO_2 に完全に分解される生分解性プラスチック材料として注目されている。本研究に使ったPHBはメタノールを基質としてメタノール資化性細菌の連続培養によって製造されたものである⁵⁾。本研究ではFig.1に示すペレット状態のPHB(直径1.8mm、長さ3.5mmの円柱状)を使った。

2) 供試脱窒微生物

回分脱窒実験には実験室で室温にてメタノールおよび KNO_3 を主体とする脱窒培地を用いて長期間fill and draw

Fig. 1 PHB(pellet form)

法にて馴養調製した脱窒汚泥を用いた。馴養期間中の馴養脱窒活性汚泥の濃度は4000~5000mg/l前後で維持し、 $\text{NO}_3\text{-N}$ -SS負荷量は0.1~0.13g/g・dに維持した⁶⁾。PHBを埋め込んだ土壌カラム実験では土壌中の微生物を利用して脱窒試験を行った。

3) 供試土壌

熊本県玉名郡菊水町から採取したマサ土を9.5mmのふるいを通した後、実験に供した。

2. 2 実験方法

1) 脱窒活性汚泥を用いた回分脱窒実験

PHBを炭素源として使用することで地下水の脱窒処理が可能かどうか、回分脱窒実験で検討した。Fig. 2に回分脱窒実験装置の模式図を示した。回分脱窒実験はPHBペレットを50g、 KNO_3 を主体とするTable 1に示す組成の無機培地、5 lに脱窒汚泥をMLSSとして4 g/lの濃度で投

Fig. 2 Schematic diagram of batch denitrification reactor

Table 1 Composition of culture media used for denitrification sludge

Composition	concentration(mg/l)
KNO_3	3,017
K_2HPO_4	140
KH_2PO_4	20
NaCl	6
KCl	2.8
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.1

入して行った。水温は25℃で行った。リアクターは直径5 cmのタービン型の翼2枚を用いて135rpmで緩速攪拌した。 $\text{NO}_3\text{-N}$ がほとんど脱窒除去された時点で、再び KNO_3 を加えて回分脱窒実験を継続した。

2) PHBを埋め込んだ土壌カラムを用いた連続脱窒実験

カラムは塩化ビニル製の円柱カラム2本を用いた。2本とも容量は17l(内径15cm、長さ100cm)である。カラムの一番下に3.5cm高さとなるよう5号碎石を入れて固めた。カラムの中に充填した土が物理的に均一になるよう、土を20層に分けて充填した。下から1層目から7層目はマサ土のみ、8層目から13層目まではマサ土と342gのPHBを混合したもの、14層目から20層目まではマサ土のみを充填した。土壌を充填したカラムの容量は15lであった。対照カラムには1層目から20層目までマサ土のみを充填した。一番上にポリエステル製不織布(日本バイリーン製)を入れた。そして、カラムの中間部にサンプリング孔を設置し、随時PHBの表面変化の観察と脱窒汚泥のサンプリングができるように設計した。Fig. 3に連続カラム脱窒試験装置の写真を示した。

連続カラム脱窒試験では同一条件(流入水 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度10~30mg/l、流入量3 l/日)で下向流にて連続運転し、比較試験を行った。大学の水道水(構内の深さ40mの井戸からの水と熊本市の水道水がブレンドされたもの)に KNO_3 を所定の濃度になるように補填したものを供給水にした。水道水にはTOCが1 mg/l程度の濃度で含まれて

Fig. 3 Soil column experimental apparatus

いた。その後、PHBの充填量を171g、85gに低下させた同様のカラム試験を行い、PHB充填量の脱窒率に及ぼす影響を検討した。実験は室温（10℃～26℃）にて行った。

水質分析方法は全て上水試験方法⁷⁾に準じて行った。その外にも、実験過程でのPHBの表面状態の変化を実体顕微鏡（ニコンSMZ1500）で観察した。

3. 結果および考察

3.1 回分脱窒実験

1) 各態窒素濃度の経時変化

PHBを脱窒の水素供与体とした回分脱窒実験における各態窒素濃度の経時変化をFig. 4に示した。各回分脱窒試験において反応時間は遅いものの、PHBを水素供与体として $\text{NO}_3\text{-N}$ を完全に除去できた。開始当初、脱窒汚泥がPHBに馴養していないことに伴う $\text{NO}_2\text{-N}$ や、汚泥の内生脱窒に伴うと思われる $\text{NH}_4\text{-N}$ が上澄液中に検出されたが、2ヵ月後には $\text{NO}_2\text{-N}$ や $\text{NH}_4\text{-N}$ は検出されなくなった。

2) 脱窒速度の変化

PHBを脱窒の水素供与体とする回分脱窒実験における脱窒速度の経時変化をFig. 5に示す。このグラフから回分

Fig. 4 Results of batch denitrification experiment using PHB pellet as H-donor.
Symbols: ■, $\text{NO}_3\text{-N}$; ○, $\text{NH}_4\text{-N}$; ▲, $\text{NO}_2\text{-N}$

Fig. 5 Changes of specific denitrification rates during repeated batch cultures

培養の回数を重ねるにつれて脱窒速度は $4 \text{ mg-N/g-MLSS} \cdot \text{d}$ から最高 $10 \text{ mg-N/g-MLSS} \cdot \text{d}$ と 2 倍以上に増加した。このことは、脱窒汚泥のPHB分解能が回分培養を重ねることで高まったことを示している。

3) PHBの重量変化

回分実験におけるPHB重量の経時変化をFig. 6に示した。PHB重量は反応開始時の50gから175日経過後13.6gにまで減少し、PHBが脱窒過程で炭素源に利用され重量が減少したことを示している。

4) PHBペレット表面の経時変化

実験終了後、毎回添加したペレット状のPHBを取り出してPHBペレットの表面状態を実体顕微鏡で観察した。脱窒汚泥によってPHBペレットが分解され、本来滑面であったペレットの表面が凸凹になることが観察された。実験84日経過後のPHB表面の実体顕微鏡写真をFig. 7に示した。

3.2 連続カラム脱窒実験

1) 処理水 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の経時変化

PHBを脱窒の水素供与体として342g埋め込んだカラムとマサ土のみを充填した連続カラム実験の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の経時変化の比較をFig. 8に示す。PHBを埋め込んでいない対照カラムの流出水の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は流入水とほぼ同じ濃度で、水素供与体不足で $\text{NO}_3\text{-N}$ の除去が全く起こらない

Fig. 6 Time course of PHB weight in batch tests

Fig. 7 Change of surface condition for PHB pellet
Symbols: A, at start of experiment, and; B, after 84 days of treatment

ことがわかる。一方、PHBペレットをカラムの中間部に埋め込んだカラムでは、反応開始当初は $\text{NO}_3\text{-N}$ が除去されなかったものの、10日目以降明らかに $\text{NO}_3\text{-N}$ が除去されているのが分かる。PHBペレットを埋め込んだカラムの脱窒能を明らかにするために、流入させる $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を段階的に50mg/lにまで高めた。50mg/lの流入 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度であっても処理水の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は10mg/l以下に脱窒処理され、PHBが脱窒の水素供与体として土壤微生物に有効に利用されることを示している。50日後に、完全に $\text{NO}_3\text{-N}$ を除去させるために流入させる $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を12mg/lに低下させた。その後20日かけて $\text{NO}_3\text{-N}$ が完全に除去されているのを確認しながら、流入 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を30mg/lに高めた。70日以降は、流入水の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を30mg/lに一定に維持した試験を行った。80日前後と105日前後に処理水の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が一時的に5mg/l程度まで高まったが、数日で0mg/lのレベルに低下した。110日以降は30mg/lの $\text{NO}_3\text{-N}$ がPHBを埋め込んだ土壤カラム中で完全に安定して除去できた。

PHB添加量を171gあるいは85g埋め込んだ土壤カラム試験の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の経時変化をFig. 9に示した。試験開始

Fig. 8 $\text{NO}_3\text{-N}$ removal in continuous flow soil column experiments.

Symbols: ○, influent; ■, effluent of soil column with PHB(342g); ▲, effluent of soil column without PHB

Fig. 9 $\text{NO}_3\text{-N}$ removal in continuous flow soil column experiments.

Symbols: ▲, influent; ■, effluent of soil column with 171g PHB; ○, effluent of soil column with 85g PHB

10日目までは $\text{NO}_3\text{-N}$ が完全に除去されないが、10日目以降はほぼ完全に除去された。PHBを171g埋め込んだ土壤カラム試験では80日の試験期間中、流入水の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を20mg/lに高めても $\text{NO}_3\text{-N}$ がほぼ完全に除去された。一方、PHBを85g埋め込んだ土壤カラム試験では40日以降171g埋め込んだカラムよりも流出水の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が高くなり、60日以降では $\text{NO}_3\text{-N}$ が5mg/lを超え、水素供与体不足で脱窒効率が低下したものと考えられる。

2) TOC濃度の経時変化

PHBを342g埋め込んだカラムとマサ土のみを充填した土壤カラム試験のTOC濃度の経時変化をFig. 10に示す。対照カラムの流出水のTOC濃度は流入水のTOC濃度とは同じレベルであった。一方、PHBを342g埋め込んだカラムの流出水のTOC濃度は時間の経過と共に濃度が高まり、100日後には38mg/lにまで上昇した。流入水の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を30mg/lに設定した期間で110日以降処理水のTOC濃度は20mg/lを維持した。この処理水のTOC濃度の上昇は、カラムに埋め込んだPHB量が多く、土壤微生物によって分解されたPHBが全て脱窒の水素供与体として使われずに処理水にTOCとして残存したとと考えられ、PHBを利用する地下水脱窒処理では添加するPHB量によって処理水のTOC濃度が変動することが示唆された。

PHBを171gあるいは85g埋め込んだ土壤カラム試験におけるTOC濃度の経時変化をFig. 11に示す。PHBを171gを埋め込んだ土壤カラム試験では、試験開始当初流出水のTOCは20mg/lを越えたが、10日後に5mg/l以下に低下し、その後10mg/lまで再び高まった後、50日以降はほぼ5mg/l以下の低いレベルを維持した。このPHBを脱窒の水素供与体として埋め込んだ土壤カラム試験における流出水のTOCの流出パターンは10日目までは脱窒を伴わない土壤微生物によるPHBの分解、10日～40日までは脱窒を

Fig. 10 Time courses of TOC concentration in continuous flow soil column experiments.

Symbols: ○, influent; ■, effluent of soil column with PHB(342g); ▲, effluent of soil column without PHB

Fig. 11 Time courses of TOC concentration in continuous flow soil column experiments.
Symbols: ○, influent; ■, effluent of soil column with 171g PHB; ▲, effluent of soil column with 85g PHB

伴うPHBの分解、40日以降はPHBを水素供与体として活用する脱窒菌の増加に伴うTOC濃度の低下と判断できる。PHBを85gしか埋め込めなかったカラムでは開始当初10mg/l近くあった流出水のTOCが5 mg/l以下に低下し、その後若干濃度が上昇した後は常に5 mg/l以下の安定したレベルが維持された。

カラムへのPHBの埋め込み量を変化させた実験の結果、試験開始後の処理成績からPHBを85g埋め込んだカラムが処理水 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、TOC濃度とも低く、一番良好な処理結果となった。しかし、60日以降は水素供与体の不足によって脱窒が不完全となり、Fig.9に示したように流出水中に $\text{NO}_3\text{-N}$ が検出されるようになった。

村澤らの固体水素供与体として高級脂肪酸組成物を用いた脱窒実験では流入水に比べ流出水のTOCが低くなることを認め、脂肪酸自身の溶出による有機物発生がないこと、関与する微生物による有機物除去機能が働いていると推察している⁸⁾。今後、PHBを活用する脱窒処理においても、流出水のTOCの中味を詳細に検討する必要がある。

以上、流入水の流量を3 l/日にしめ固めたマサ土を充填した15lの土壌カラムの中央部にPHBを埋め込むだけで $\text{NO}_3\text{-N}$ に汚染された地下水の脱窒処理が可能であることを実験的に認めた。長期間安定して地下水の脱窒処理を行うにはPHBの補填量とともに、追加の補填方法を考慮しなければならないことが分かった。15lの土壌カラムに85gのPHBを充填したカラムでは実験開始40日までは良好な脱窒処理が認められたが、40日以降は炭素源

不足から脱窒率が低下した。

4. まとめ

- 1) PHBを活用した回分脱窒実験では回分培養を重ねるごとに脱窒活性が向上した。PHB重量は回分試験を重ねるにつれて減少し、PHBペレットの表面が凸凹になりPHBが脱窒過程で炭素源に利用されることが認められた。
- 2) 下向流での連続土壌カラム試験でPHBを補填したカラム流出水の $\text{NO}_3\text{-N}$ は50日後以降に完全に脱窒除去された。
- 3) PHB量を342g、171gと85gで充填した3本の土壌カラムとマサ土のみを充填した対照カラムで連続カラム試験を行い、PHBを充填したカラムで脱窒反応の起きていることを確認した。PHB量を171g充填したカラムで一番いい脱窒処理が達成できた。PHB量を85g充填したカラムは40日以降、炭素源不足で脱窒効果が低下した。

参考文献

- 1) 平田健正：硝酸性窒素による地下水汚染—(1)汚染の特徴、地下水技術、Vol.42, No.9, pp.102-111 (2000)
- 2) 国包章一、眞柄泰基：地下水の窒素汚染とその原因に関する基礎的考察、衛生工学研究論文集、Vol.20, pp.121-130 (1984)
- 3) 廣畑昌章、小笹康人、松崎達哉、藤田一城、松岡良三、渡辺征紀：熊本県U町の硝酸性窒素による地下水汚染機構、地下水学会誌 Vol.41, No.4, pp.291-306 (1999)
- 4) 平田健正：硝酸性窒素による地下水汚染—(2)汚染の修復技術、Vol.42, No.10, pp.112-120 (2000)
- 5) 浦上貞治：バイオグリーン、プラスチック、Vol.50, No.6, pp.107-111 (1999)
- 6) 黒木征一朗：光依存性脱窒汚泥を用いる無酸素条件下での染料排水の連続処理に関する研究、熊本大学自然科学研究科博士論文 (2001)
- 7) 日本水道協会編：上水試験方法2001年版、日本水道協会、pp.107-237 (2001)
- 8) 村澤浩一郎、納村和美、森崎久雄、佐野明美、寺田剛史、田井中善雄：高級脂肪酸を水素供与体として用いた水路の直接脱窒、水環境学会誌、Vol.25, No.12, pp.737-742 (2002)

(受付 2003.4.2)

(受理 2003.7.31)