

# 電力中央研究所報告

排水中の窒素除去に関する研究（その10）  
—ポリ乳酸を用いたバイオリアクターの  
窒素除去活性の向上と長期安定化—

研究報告：V04027

平成17年6月

**R** **CRIEPI**



# 排水中の窒素除去に関する研究（その 10） —ポリ乳酸を用いたバイオリアクターの窒素除去活性の向上と長期安定化—

渡邊 淳\*<sup>1</sup> 植本 弘明\*<sup>2</sup> 森田 仁彦\*<sup>1</sup>

キーワード：硝化

脱窒

固定化細菌

排水処理

生分解性プラスチック

Key Words : Nitrification

Denitrification

Immobilized bacteria

Wastewater treatment

Biodegradable plastic

## Development of biological wastewater treatment system for nitrogen removal Part 10. - Improvement and stabilization of nitrogen-removal activity of bioreactor using poly(lactic acid) as energy source -

by Atsushi Watanabe, Hiroaki Uemoto and Masahiko Morita

### Abstract

Poly(lactic acid), which is a biodegradable plastic, was decomposed to monomer or oligomer of lactic acid by hydrolysis. To determine an elution profile of lactic acid from poly(lactic acid), we have investigated the hydrolysis of four poly(lactic acid)s, PLGA1000, PLA2000, PLA3000 and PLA6000, with a range of molecular weight 1000-6000 in physiological saline. PLGA1000, which was molecular weight of 1000, eluted lactic acid after the experiment start immediately and released 95% of the carbon as monomers or oligomers of lactic acid after 60 days. Other high molecular weight poly(lactic acid)s were decomposed with lag times that depended on the molecular weight. To elute lactic acid constantly over a long period, a poly(lactic acid) blended of PLGA1000, PLA3000 and PLA6000 was prepared. The blend was decomposed without lag times and constantly eluted lactic acid more than three months.

To study denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* by using poly(lactic acid) as energy source, batch treatment of an artificial wastewater including nitrate was carried out with polymeric gel immobilized *P. denitrificans*. The immobilized gel was low denitrification activity, approximately 0.2 g-N/day/m<sup>2</sup>, regardless quantity of poly(lactic acid)s. However, by using of poly(lactic acid)s mixed with tricalcium phosphate, the activity of the immobilized gel depended on quantity of poly(lactic acid)s and was improved to 1.2 g-N/day/m<sup>2</sup>.

---

(平成 17 年 3 月 31 承認)

\*<sup>1</sup> バイオテクノロジー領域 主任研究員

\*<sup>2</sup> バイオテクノロジー領域 上席研究員

The bioreactor using poly(lactic acid) as energy source was constructed with a polymeric gel-plate, which was immobilized the pure-cultured cells of *Nitrosomonas europaea* and *P. denitrificans*, and a biodegradable plastic-plate. One surface of the gel-plate was in contact with an artificial wastewater, while the other side of it was in contact with the biodegradable plastic-plate. The biodegradable plate was prepared by mixing three kinds of poly(lactic acid)s, PLGA1000, PLA3000 and PLA6000, and tricalcium phosphate. Batch treatment experiment with the bioreactor was continuously carried out with 500 mL of artificial wastewater containing 100 mg-N/L of ammonia. Nitrogen-removal rate and ammonia-oxidation rate of the bioreactor were approximately 3 and 6 g-N/day per square meter of gel-plate surface, respectively. These activities of the bioreactor were maintained for over 90 days. This result shown that the bioreactor using poly(lactic acid) as energy source could effectively remove nitrogen from wastewater as bioreactor using ethanol.

(Environmental Science Research Laboratory Rep.No.V04027)

## 背 景

閉鎖系水域など水域環境の保全を図るために、排水に対する窒素化合物の規制が厳しくなっている。当所では、窒素化合物を排水中から効率よく除去するバイオリアクターの開発を行っており、大型化したバイオリアクターによる発電所の実排水を用いた実証試験を実施してきた。その一方で、バイオリアクターの構造を単純化することにより、バイオリアクターの適応場面を広げる検討を進めている。これまでに、生分解性プラスチックであるポリ乳酸を脱窒菌のエネルギー源として利用することで、エネルギー源を供給する装置が不要となり、バイオリアクターの構造の簡素化が可能であることを示した。しかし、このバイオリアクターを実際の排水処理に適応するためには、窒素除去活性の向上を図るとともに長期間の連続処理を可能にすることが不可欠である。

## 目 的

エネルギー源として有効なポリ乳酸の組成条件を検討し、ポリ乳酸を用いた窒素除去バイオリアクターの処理能力の向上と長期安定化を図る。

## 主な成果

### 1. エネルギー源として長期利用が可能なポリ乳酸の検討

長期間、エネルギー源として利用できるポリ乳酸を検討するために、分子量の異なるポリ乳酸について加水分解試験を実施した。その結果、加水分解が始まるまでの誘導期間はその分子量に依存するものの、分解期間には大きな差がなく、単一の

ポリ乳酸ではエネルギー源として長期利用は困難であることが明らかとなった。しかし、複数のポリ乳酸を均質に混合することで、誘導期間もなく3ヶ月以上に渡って徐々に分解することが明らかとなり、エネルギー源として長期間、安定して利用できることが示された。

## 2. 窒素除去活性の向上のための条件検討

高分子ゲルに固定化した脱窒菌を用い、エネルギー源であるポリ乳酸の固定化量を変えてその脱窒活性の検討を行った。その結果、ポリ乳酸の分解に伴うpH低下のため、固定化量に比例した脱窒活性の向上は確認できなかった。しかし、ポリ乳酸にリン酸三カルシウムを添加することで、pH低下を抑制するとともに、その固定化量に依存した脱窒速度を得ることが可能となった。

## 3. アンモニア酸化菌と脱窒菌を用いたバイオリアクターによる長期連続処理

3種類のポリ乳酸を混合したエネルギー源と微生物を固定化した膜状ゲルを組み合わせたバイオリアクターを作製し、その処理能力を検討した。窒素除去速度は約3~4 g-N/day/m<sup>2</sup>と求められ、エタノールなどをエネルギー源とした従来のバイオリアクターと同程度の処理能力が確認された。また、この窒素除去活性は3ヶ月以上維持されており、新たにエネルギー源を追加しなくても長期間、安定的に連続処理が可能であった。

以上の結果、ポリ乳酸を組み合わせるとともに固定化量を調節することで、バイオリアクターの窒素除去活性の向上と長期安定化ができ、ポリ乳酸を用いた構造を簡素化したバイオリアクターの実用化が可能となった。

## 今後の展開

ポリ乳酸を用いたバイオリアクターについて、大型化の検討を行う。

関連報告書：「排水中の窒素除去に関する研究 7-9」 U01015, U02031, V04003 (2001.9, 2003.3, 2004.8)

# 目 次

1. 緒言	1
2. 方法	2
2-1 供試菌株と試薬	2
2-2 ポリ乳酸の加水分解試験	2
2-3 ポリ乳酸をエネルギー源とした膜状ゲルの脱窒活性	3
2-4 バイオリアクターによる模擬排水の連続処理	3
3. 結果	4
3-1 ポリ乳酸の加水分解	4
3-2 リン酸三カルシウムの添加によるポリ乳酸の加水分解への影響	4
3-3 混合したポリ乳酸の加水分解	5
3-4 固定化脱窒菌を用いた硝酸排水のバッチ処理	6
3-5 バイオリアクターによるアンモニア排水の処理	7
4. 考察	8
4-1 ポリ乳酸の加水分解速度とバイオリアクターへの適応について	8
4-2 ゲルに固定化した脱窒菌の脱窒活性	9
4-3 ポリ乳酸をエネルギー源としたバイオリアクターの窒素除去能力の評価	10
4-4 生分解性プラスチックをエネルギー源としたバイオリアクターの適応について	11
5. 謝辞	12
6. 参考文献	12

## 1. 緒言

湖沼、閉鎖性海域へ流入するアンモニアなどの窒素化合物は、富栄養化の原因物質の一つであるため、窒素化合物を含んだ排水に関して厳しい規制が進められている<sup>1,2)</sup>。昭和53年から導入された水質総量規制制度においても、第5次水質総量規制（平成13年12月に策定）から窒素含有量およびリン含有量も指定項目となり、CODに加えて規制の対象となった。そのため、第5次水質総量規制が施行される平成16年度から、東京湾、伊勢湾および瀬戸内海といった関係20都府県全体で、窒素の削減目標として平成11年度における汚染負荷量の96%にすることが求められている。

このような状況下、当所では、排水中に含まれるアンモニア等の窒素化合物を効率的に処理することを目的として、硝化と脱窒を同時に行うことのできる窒素除去用のバイオリアクターの開発を検討している<sup>3,9)</sup>。このバイオリアクターは、アンモニア酸化菌と脱窒菌を一緒に固定化した膜状の高分子ゲルを反応槽に充填した構造をしている。排水中のアンモニアは、微生物を固定化した膜状の高分子ゲルの一方の表面において亜硝酸に酸化され、生成した亜硝酸はゲル内部において窒素ガスまで還元され、除去される。また、脱窒反応に必要なアルコール等のエネルギー源は、ゲルの他方の面から供給するため、排水中に直接エネルギー源を添加することなく処理することができる。これまでに、このバイオリアクターの実用化を目指し、1~2m<sup>3</sup>規模の大型化した処理装置を作製し、火力発電所の実排水を用いた実証試験を進めている<sup>8,9)</sup>。

その一方で、このバイオリアクターの適応範囲を広げることを目的とし、アルコール等の溶液に代わるエネルギー源として固体物質である生分解性プラスチックを用いたバイオリアクターの開発を行った<sup>7)</sup>。生分解性プラスチックは、

自然環境中で微生物などによって徐々に分解、資化される高分子化合物であり、バイオリアクターにおいては、脱窒菌に対する徐放性のエネルギー源として利用できる。このような固体のエネルギー源を使用することで、従来、必要であったアルコール溶液などのエネルギー源を供給するための設備が不要となる。これにより、バイオリアクターの構造を大幅に単純化することができ、使い捨て化や既存の排水処理施設の処理槽や貯水槽への投入など、バイオリアクターの適応範囲の拡大が期待できる。

これまでに、生分解性プラスチックの一種である乳酸を主成分とするポリ乳酸および乳酸・グリコール酸共重合体をエネルギー源として使用し、バイオリアクターの窒素除去活性を検討してきた<sup>7)</sup>。ポリ乳酸は、主に化学的な加水分解によって低分子化し<sup>10)</sup>、乳酸やグリコール酸等の微生物が利用できる可溶性の有機物を徐々に溶出するため、プラスチックを分解するための微生物を追加する必要がない。そこで、ポリ乳酸の粉末をアンモニア酸化菌および脱窒菌と共に膜状の高分子ゲルに固定化したバイオリアクターを作製し、アンモニア態窒素を含む模擬排水を用いて窒素除去活性を検討した<sup>7)</sup>。その結果、新たにエネルギー源を追加することなく、一ヶ月間程度、排水の連続処理が可能であることが示された。しかし、この窒素除去速度は低く、エネルギー源としてエタノール溶液を用いた従来のバイオリアクターに比べて1/6~1/7程度であった。従って、ポリ乳酸をエネルギー源として用いたバイオリアクターを実際の排水処理に適応していく場合、窒素除去活性を向上する必要がある。また、バイオリアクターの活性の長期安定化は、運用コストの削減にも繋がるため、活性を長期間、安定的に維持する方法の検討も重要となる。

ポリ乳酸等をエネルギー源としたバイオリアクターの窒素除去速度は、ポリ乳酸の加水分解

によって溶出する乳酸等の可溶性の有機物量が律速となっていることが示唆されている<sup>7)</sup>。従って、バイオリアクターの処理速度を向上し、且つ長期安定化させるためには、ポリ乳酸から溶出する有機物量が窒素除去活性の律速とならないようにするとともに、長期間安定的に溶出し続ける必要がある。また、ポリ乳酸の分解によって生成する乳酸等の可溶物は有機酸であり、過剰に存在することでpHの低下を引き起こし、微生物の活性を阻害する原因となる可能性がある。そのため、ポリ乳酸から溶出する乳酸等によるゲル内部のpH低下をある程度制御することも求められる。

そこで、本研究では、ポリ乳酸をエネルギー源としたバイオリアクターの処理能力の向上と長期安定化を主な目的とし、分子量の異なるポリ乳酸について加水分解による分解の特性を検討し、バイオリアクターに用いる適当なポリ乳酸の条件を検討するとともに、実際にバイオリアクターにエネルギー源として用い、その窒素除去活性および長期安定性を評価した。

## 2. 方法

### 2-1 供試菌株と試薬

本研究で使用したポリ乳酸および乳酸-グリコール酸共重合体を表に示す。ポリ乳酸は、分子量またはグリコール酸の組成比の異なる4種類を用意した。これらの生分解性プラスチックは、すべて多木化学(株)より入手した。

バイオリアクターに固定化するアンモニア酸化菌および脱窒菌は、それぞれ *Nitrosomonas europaea* IFO-14298 ((財)発酵研究所より分譲) および *Paracoccus denitrificans* JCM-6892 (理化学研究所微生物系統保存施設より分譲) を用いた。*N. europaea* および *P. denitrificans* の培養操作は、前報告書に従って行った<sup>3)</sup>。

### 2-2 ポリ乳酸の加水分解試験

供試したポリ乳酸の加水分解の速度を求めるために、生理食塩水中でポリ乳酸の加水分解を検討した。ポリ乳酸は液体窒素中で粉碎し、その約0.5gを30mL容量のバイアルに量り取った。180°Cで20分間加熱後、放冷することによって、バイアルの底部にポリ乳酸の層を形成させた。ポリ乳酸を固定したバイアルに、0.02%アジ化ナトリウムを含む0.2%生理食塩水(初期pH7に調整)を25mL添加し、25°C、100rpmで振とうすることにより、ポリ乳酸の加水分解を行った。実験開始後、経時的にサンプリング(2mL)し、総有機炭素濃度(TOC濃度)およびpHを測定した。サンプリング後のバイアルには、同量の生理食塩水を添加して溶液量の調整を行った。ポリ乳酸の分解は、初期に固定化したポリ乳酸の炭素量に対する生理食塩水中に溶出した有機炭素量の割合を指標にした。なお、TOC濃度の分析は、TOC分析計(TOC-650、東レエンジニアリング製)を用いて行った。実験は、表に示す各ポリ乳酸を単独で使用した場合、およびポリ乳酸にリン酸三カルシウムを重量比で1:0.6の割合で混合した場合について行った。さらに、3種類のポリ乳酸(PLGA1000、PLA3000およびPLA6000)を等量混合したポリ乳酸とリン酸三カルシウムを混合したものについても同様に加水分解試験を行った。

表 ポリ乳酸の組成と分子量

	LA/GA (mol%)*1	Mn (g/mol)*2
PLGA1000	50/50	1000
PLA2000	100/0	1960
PLA3000	100/0	3150
PLA6000	100/0	6170

\*1: <sup>1</sup>H-NMRCによる乳酸、グリコール酸組成比 \*2: 数平均分子量

## 2-3 ポリ乳酸をエネルギー源とした膜状ゲルの脱窒活性

ポリ乳酸をエネルギー源とした場合について、高分子ゲルに固定化した脱窒菌の脱窒速度を検討するために、硝酸を含む模擬排水のバッチ処理を行った。2-2と同様の方法で30 mL容量のバイアルの底部にポリ乳酸を含むエネルギー源の層を形成させ、脱窒菌を懸濁した光硬化性樹脂 PVA-SbQ (SPP-H-13、(株) 東洋合成工業) を2 g 重層した。メタルハライドランプによる光照射によって光硬化性樹脂を固化し、エネルギー源の層の上に脱窒菌を固定化した高分子ゲルを重層した。エネルギー源としては、2種類のポリ乳酸 (PLGA1000 と PLA6000) を等量混合し、これを単独で使用したものとリン酸三カルシウムを重量比 1:0.6 で添加したものを使用した。その添加量は、バイアルに対してポリ乳酸量 (PLGA1000 と PLA6000 の総重量) で 0.1 ~ 2 g になるようにした。ポリ乳酸および脱窒菌を固定化した高分子ゲルを重層したバイアルに模擬排水を 20 mL 添加し、25°Cの恒温槽中で振とうしながらバッチ処理を行った。模擬排水は、前報告書の成分のうち、窒素成分である硫酸アンモニウム代わりに硝酸カリウムを 100 mg-N/L になるように添加し、さらにリン酸塩を除いたものを使用した<sup>3)</sup>。実験開始後、経時的にサンプリングを行い、模擬排水の亜硝酸、硝酸濃度および pH を測定した。亜硝酸および硝酸濃度は、前報告書に従って、イオンクロマトグラフィによって分析した<sup>3)</sup>。模擬排水は2~4日に1回新しいものに交換してバッチ処理を繰り返した。

## 2-4 バイオリアクターによる模擬排水の連続処理

アンモニア酸化菌および脱窒菌を同時に固定

化した膜状ゲルを用いたバイオリアクターによるアンモニアを含む模擬排水の連続処理を行った。本実験で使用した実験装置の模式図を図 1 に示す。前報告に従って純粋培養したアンモニア酸化菌および脱窒菌を光硬化性樹脂を用いて固定化し、膜状 (50 x 100 x 1 mm) に成型した<sup>7)</sup>。バイオリアクターは、この膜状ゲルの片方の面に処理水、他方の側面にエネルギー源 (50 x 100 x 2 mm) が接する構造にした。エネルギー源は、3種類のポリ乳酸 (PLGA1000、PLA3000 および PLA6000) を等量混合し、さらにリン酸三カルシウムを添加したものを 180°Cで 20 分間加熱することによって成型した。なお、ポリ乳酸とリン酸三カルシウムの組成は重量比で 1:0.6 とし、この混合物を 18g 使用した。処理水としては、100 mg-N/L のアンモニアを含み、リン酸塩を除いた模擬排水 500 mL を用い、ポンプによってバイオリアクターに循環した。模擬排水は 25°Cに維持するとともにエアレーションによって酸素を供給した。実験開始後、経時的に模擬排水のサンプリングを行い、窒素濃度、pH、TOC 濃度およびリン酸濃度の測定を行った。なお、模擬排水は3~4日に1回新しいものに交換し、バッチ処理を繰り返すことによって 100 日程度実験を継続した。

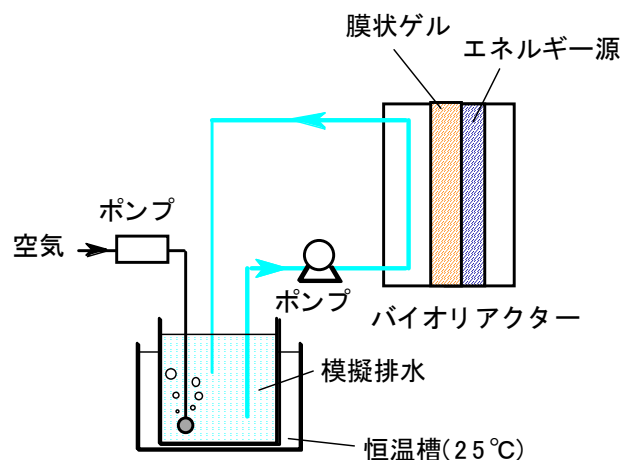


図 1 実験装置の模式図

### 3. 結果

#### 3-1 ポリ乳酸の加水分解

ポリ乳酸の種類による加水分解の違いを検討するために、ポリ乳酸の加水分解に伴って溶液中に溶出する有機物量を指標にして、その分解率を経時的に求めた。ここでは、表に示すような分子量の異なるポリ乳酸を用い、分子量の違いによる加水分解の差を検討することとした。乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA1000) およびポリ乳酸 (PLA2000、PLA3000 および PLA6000) の分解率および溶液の pH の経時変化を図 2 に示した。分子量の最も小さい

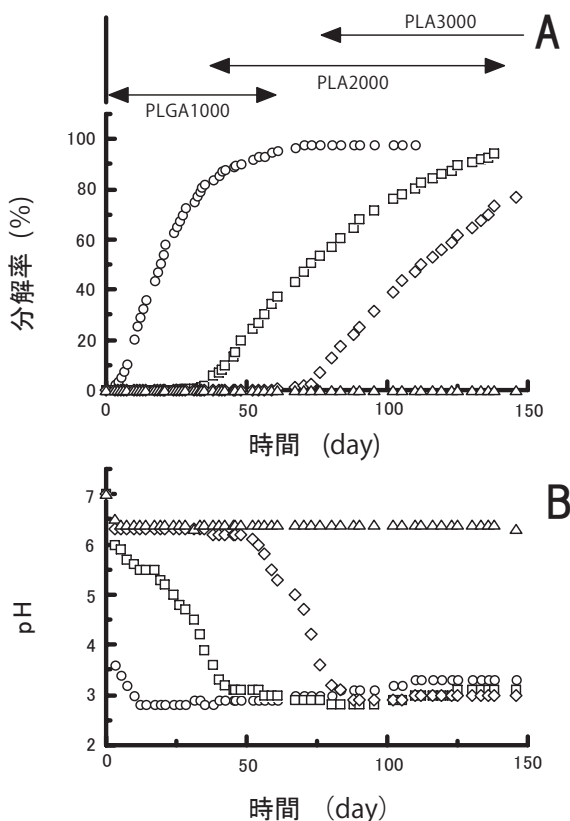


図 2 ポリ乳酸の加水分解

生理食塩水中に溶出した TOC 濃度から求めた各ポリ乳酸の分解率 (A) および pH (B) の経時変化を示す。矢印は、エネルギー源を溶出することが可能な期間を示す。○ : PLGA1000、□ : PLA2000、◇ : PLA3000、△ : PLA6000。

PLGA1000 は、試験開始直後から TOC 濃度の増加が確認され、実験開始 60 日目でその 95% が溶解した。PLA2000 および PLA3000 では、分解率の上昇はそれぞれ実験開始 40 日目頃、70 日目頃から確認され、ポリ乳酸の分子量によって有機物の溶出の始まる誘導期間が異なった。誘導期間以降の分解は、PLGA1000 よりはややかであるものの、PLA2000 と PLA3000 では同程度の速さで進行した。これらの結果は、ポリ乳酸の加水分解は、その分子量によって誘導期間は異なるが、それ以降の有機物の溶出には大きな差がないことを示している。なお、PLA6000 は、100 日間の実験期間中では TOC 濃度の上昇は確認されず、加水分解による有機物の溶出は見られなかった。一方、生理食塩水の pH は、PLGA1000、PLA2000 および PLA3000 については、溶出した有機物の増加にともなって低下し、最終的に pH2~3 にまで達した。なお、有機物の溶出が確認されなかった PLA6000 では、pH の低下はほとんどみられなかった。

#### 3-2 リン酸三カルシウムの添加によるポリ乳酸の加水分解への影響

3-1 の結果から、ポリ乳酸の加水分解に伴って、その分子量に関わらず溶液の急激な pH 低下が確認された。pH の低下は、バイオリクターに用いる脱窒菌やアンモニア酸化菌の活性に影響を与えるため、乳酸等の蓄積による pH の低下を抑える必要がある。そこで、この pH の低下をポリ乳酸にリン酸三カルシウムを添加することによって抑制できるかを PLGA1000、PLGA3000 および PLA6000 を用いて検討した。リン酸三カルシウムを添加したポリ乳酸の分解率、リン酸イオン濃度および pH の経時変化を図 3 に示した。リン酸三カルシウムを添加した PLGA1000 の加水分解は、PLGA1000 のみと比べて数日程度はやく進行したが、大きな差はな

かった。また、PLA3000では、誘導期間が1週間程度短くなり、後半でPLA3000のみの加水分解より分解率の上昇が緩やかになった。PLA6000は、リン酸三カルシウムを添加しても3-1の結果と同様に実験期間中で有機物の溶出は確認されなかった。PLGA1000およびPLA3000の生理食塩水中のリン酸濃度は、ポリ乳酸の分解に伴い上昇し、それぞれ550および800 mg/Lに達したが、その後低下した。一旦上昇したリン酸濃度が、再度減少したのは、サンプルを採取する液量が多く、サンプリング時にその液量を調整するために同量の生理食塩水を添加して希釈されたためである。PLA3000では、分解率の経時変化と同様にリン酸濃度の上昇に

誘導期間がみられ、リン酸の溶出は有機物の溶出に伴って起こっていることが示された。生理食塩水のpHは、リン酸三カルシウムを添加したポリ乳酸の加水分解においても分解率の上昇に伴ってその低下が確認された。しかし、リン酸濃度の上昇が確認された期間(図3の丸の範囲)では、PLA3000でpH4.5~5.5の範囲、PLGA1000で4~4.5の範囲で維持されていた。これは、ポリ乳酸のみの加水分解における、同じTOC濃度の時のpHと比較して、生理食塩水のpHが1~2高く維持されていたことを示している。

### 3-3 混合したポリ乳酸の加水分解

3-1の結果から、PLGA1000においては実験開始直後から加水分解による有機物の溶出が確認された。これをバイオリクターのエネルギー源として用いることで、処理開始直後から窒素除去活性が得られると期待できる。しかし、PLGA1000は、60日程度でそのほとんどが分解することから、エネルギー源として利用できる期間に限度がある。そこで、分解の遅い他のポリ乳酸(PLA3000およびPLA6000)を混合することで、長期間、安定して有機物の溶出が可能であるかを検討した。図4に3種類のポリ乳酸を混合した場合の分解率と単位時間あたりに溶出した有機物量の経時変化を示した。なお、3-2で得られた分解率の結果から、3種類を混合したポリ乳酸の予想される分解率および単位時間あたりに溶出する有機物量の計算値も示した(図4、実線)。分解率は、実験開始直後はPLGA1000の単独での加水分解より緩やかに増加した。しかし、20日目以降は、分解率の上昇は大きくなり、実験終了時までほぼ直線的に上昇した。実験終了時である98日目の最終的な分解率は90%に達した。この分解率は、個別に加水分解試験を行った結果から求めた分解率の計

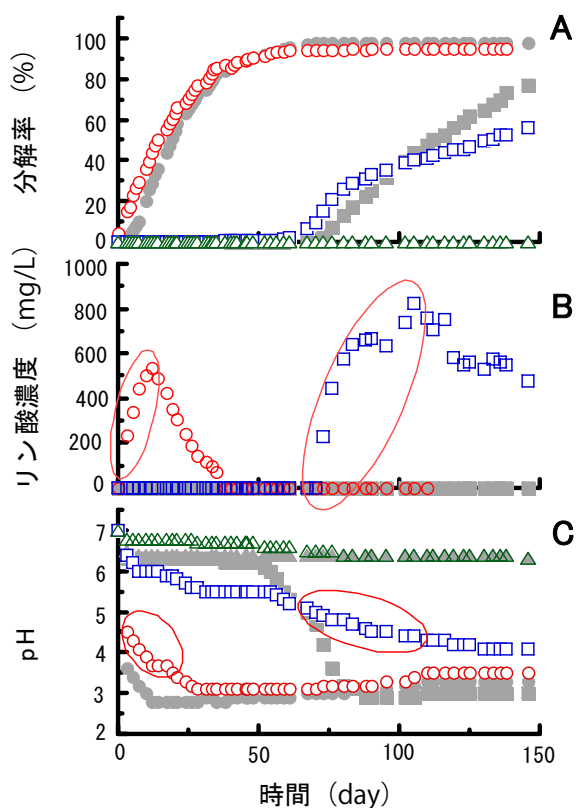


図3 リン酸カルシウムを添加したポリ乳酸の加水分解

リン酸カルシウムを添加したポリ乳酸の分解率(A)、リン酸濃度(B)およびpH(C)の経時変化を示す。リン酸三カルシウム添加したポリ乳酸、○: PLGA1000、□: PLA3000、△: PLA6000。ポリ乳酸のみ、●: PLGA1000、■: PLA3000、▲: PLA6000。

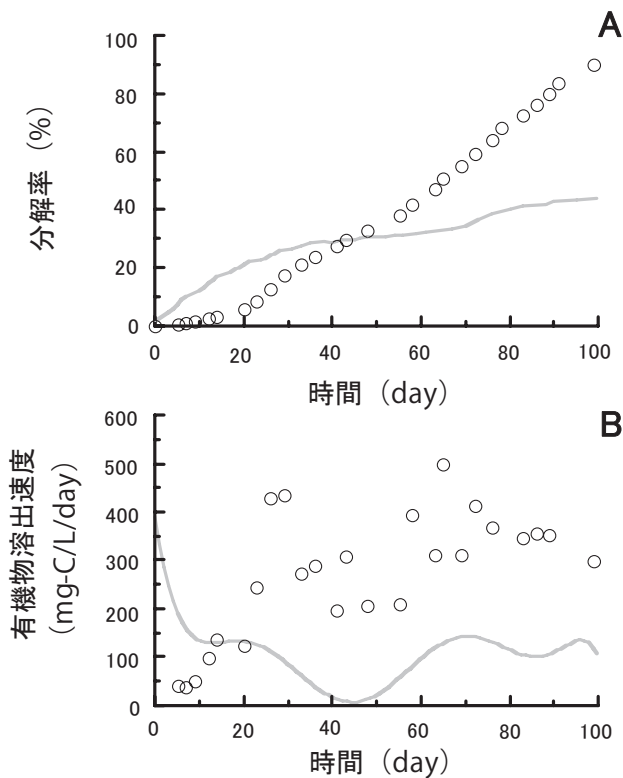


図4 混合したポリ乳酸の加水分解

3種類混合したポリ乳酸の加水分解における分解率(A)および単位時間あたりの有機物溶出量(B)の経時変化を示す。○：混合したポリ乳酸の実測値、実線：図3のPLGA1000、PLA3000、PLA6000の分解率から求めた計算値。

算値よりも高くなっており、PLA3000 および PLA6000の加水分解が促進されていることを示す結果となった。TOC濃度の変化から求めた単位時間あたりの有機物の溶出量は、実験開始後20日目付近までは計算値と比べて低かったが、それ以降は、変動はあるものの200~500 mg-C/L/dayの範囲で維持されていた。

### 3-4 固定化脱窒菌を用いた硝酸排水のバッチ処理

30mL容量のバイアル中にポリ乳酸および脱窒菌を固定化した高分子ゲルを重層し、その脱窒活性を検討した。脱窒活性は、ポリ乳酸から溶出される有機物量に依存するため、バイアルの底部に固定化したポリ乳酸量を0.1~2gに変

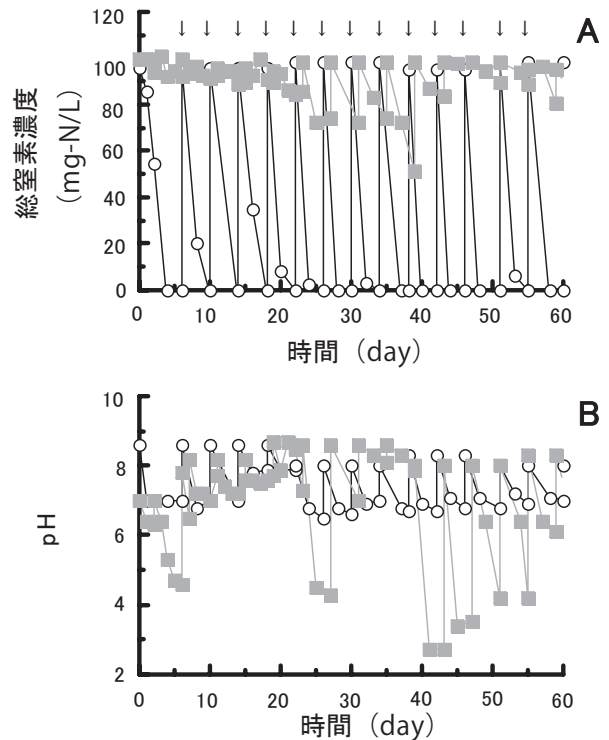


図5 ポリ乳酸をエネルギー源とした固定化窒菌による模擬排水の処理

PLGA1000とPLA6000を混合したポリ乳酸(バイアルあたり1g使用)に脱窒菌を固定化した高分子ゲルを重層し、模擬排水を処理した場合の総窒素濃度(A)およびpH(B)の経時変化を示す。矢印は模擬排水の交換を示す。○：ポリ乳酸にリン酸三カルシウムを混合したものを使用、■：ポリ乳酸のみを使用

えて実験を行った。ポリ乳酸固定量1g使用した場合の硝酸を含む模擬排水のバッチ処理における総窒素濃度(硝酸と亜硝酸の総和)およびpHの経時変化を図5に示した。リン酸三カルシウムを添加したポリ乳酸を使用した場合、模擬排水の硝酸濃度は、排水の交換後、速やかに減少し、2~4日後にはほとんど検出されなくなった。このとき、模擬排水には脱窒過程の中間体である亜硝酸は検出されず、硝酸が効率よく還元されていた。模擬排水のpHは、実験期間中7~8の範囲で維持されており、pHの極端な低下はみられなかった。一方、リン酸三カルシウムを添加しないポリ乳酸では、模擬排水の窒素濃度の減少はほとんどなく、また、すべてのバッチ処理ではないが、模擬排水のpHが3程度にまで低下することがあった。

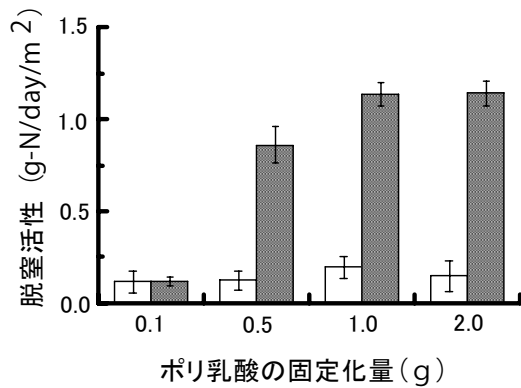


図6 固定化脱窒菌の脱窒活性の比較

バイアルあたり 0.1~2g 固定化したポリ乳酸をエネルギー源とした場合の高分子ゲルに固定化した脱窒菌の脱窒活性の平均値を比較した。白いカラム：ポリ乳酸のみを固定、黒いカラム：ポリ乳酸にリン酸三カルシウムを混合したものを固定。

ポリ乳酸の固定化量を変えた場合の脱窒活性の平均（14回のバッチ処理）を図6に示した。ポリ乳酸のみをエネルギー源とした場合では、ポリ乳酸の固定化量を増やしても、脱窒活性は大きく変わらず、単位時間あたり膜表面積あたり 0.1~0.2g-N の低い活性のままであった。リン酸三カルシウムを添加したポリ乳酸では、その添加量の増加によって脱窒活性は高くなり、ポリ乳酸の添加量が 1 g 以上では一日あたり膜表面積あたり 1.2 g-N/以上となった。これは、リン酸三カルシウムを添加したポリ乳酸をエネルギー源とすることで、その使用量を増やし、脱窒菌を固定化した高分子ゲルの脱窒活性を向上できることを示している。

### 3-5 バイオリアクターによるアンモニア排水の処理

アンモニア酸化菌および脱窒菌を同時に固定化した膜状ゲルを使用したバイオリアクターを用い、アンモニアを含む模擬排水の連続バッチ処理を行った。3-3の結果から、3種類のポリ乳酸を混合することで、100日程度安定的に有機

物を溶出することが示されたので、3-3と同様の組成のものをエネルギー源として使用した。図7にバイオリアクターによる模擬排水のバッチ処理を繰り返した場合の模擬排水の窒素濃度、pH、TOC濃度およびリン酸濃度の経時変化を示した。模擬排水のアンモニアは、模擬排水の交換後（図7、矢印）、速やかに減少し、実験初期以外では模擬排水の交換時にそのほとんどが検出されなくなった。実験開始20日目までは、硝酸が蓄積し、アンモニア、硝酸および亜硝酸の総和である総窒素濃度の減少は 20mg-N/L 程度であった。しかし、実験開始20日目以降では、模擬排水交換直後にアンモニアの急激な減少に伴って 20~40 mg-N/L 程度の硝酸の蓄積は見られるものの、その後は減少した。総窒素濃度は模擬排水を交換する直前まで低下しており、ポリ乳酸をエネルギー源としたバイオリアクターによって効率的に窒素除去が行われていたことを示している。模擬排水の pH は、実験初期に 6 以下まで低下したが、20日目以降では 7~8 で推移した。リン酸濃度および TOC 濃度は実験初期に最大 30 mg/L 程度検出されたが、実験期間を通して低い濃度で維持された。これは、エネルギー由来の有機物、リン酸はゲル膜を通してほとんど模擬排水中に溶出しなかったことを示している。バッチ処理による窒素濃度の経時変化をもとに、このバイオリアクターのアンモニア酸化速度 ( $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ )、および脱窒まで考慮した窒素除去速度 ( $\text{NH}_3 \rightarrow \text{N}_2$ ) の経時変化を求めた（図8）。アンモニア酸化速度は、5~7g-N/day/m<sup>2</sup>で実験終了時まで維持された。窒素除去速度は、実験開始直後は、1 g-N/day/m<sup>2</sup>程度であったが、その後徐々に上昇し、20日目以降では 3~4g-N/day/m<sup>2</sup>で安定した。この窒素除去速度は、多少の変動はあるものの、実験終了時まで維持されており、長期間、安定的に窒素除去ができることが示された。

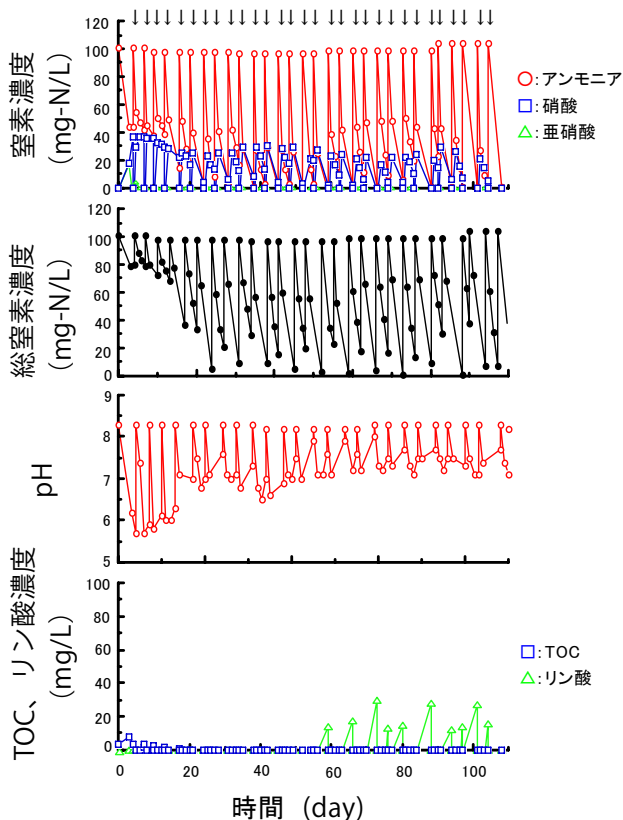


図7 バイオリアクターによる模擬排水の処理  
3種類混合したポリ乳酸をエネルギー源としたバイオリアクターを用いて模擬排水のバッチ処理を繰り返し行った。矢印は模擬排水の交換を示す。

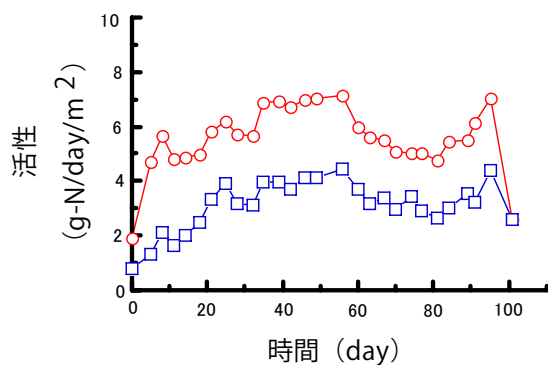


図8 バイオリアクターの活性の経時変化  
バイオリアクターによる模擬排水のバッチ処理におけるバイオリアクターのアンモニア酸化速度 (○) および窒素除去速度 (□) の経時変化を示す。

## 4. 考察

### 4-1 ポリ乳酸の加水分解速度とバイオリアクターへの適応について

ポリ乳酸の加水分解に伴って溶出される乳酸などのモノマーや水溶性オリゴマーの溶出量が、バイオリアクターの窒素除去活性を左右すると考えられる。そこで、エネルギー源として適切なポリ乳酸の組成について検討するために、分子量の異なるポリ乳酸について加水分解試験を行った。その結果、ポリ乳酸の分子量の違いによって、分解率が上昇し始める誘導期間に違いが確認された。しかし、誘導期間以降の分解速度には大きな差はなく、PLA2000 と PLA3000 とで同程度の速度で有機物が溶出していた。ポリ乳酸の分解には、表面分解機構と塊状分解機構の2種類の分解機構がある<sup>11)</sup>。中性付近でのポリ乳酸の加水分解は、塊状分解によって進み、次の二段階の現象が見られる。第一段階は、高分子の低分子化のみが進行し、ポリ乳酸自体の重量の低下を伴わない分解、第二段階は、溶液に溶解できるほど低分子化が進行してモノマーや可溶性オリゴマーを溶出しながらポリ乳酸の重量低下を伴った分解である。本実験の結果でも、その分子量によって誘導期間は異なるが、その後は一定の速さで溶出しており、塊状分解の特徴を示していた。従って、PLGA1000 など特定の分子量のポリ乳酸を単独でエネルギー源として使用した場合、一定の期間の有機物の溶出は期待できるが、その活性は一定期間しか維持できず、長期間の連続的な利用には耐えられないと考えられた。

ポリ乳酸の分解を長期間、連続的に行うための検討は、ポリ乳酸をドラッグデリバリーシステムへ応用する研究において行われており、低分子量のポリ乳酸と高分子量のポリ乳酸を混合することによって、混合したポリ乳酸の中間的

な速さで重量低下が起こることが示されている<sup>12,13)</sup>。そこで、分子量約 1000、3000 および 6000 の 3 種類のポリ乳酸を混合することで、長期間、安定的に有機物の溶出が可能であるかを検討した。その結果、試験開始直後は PLGA1000 の単独の場合より緩やかに分解率は増加するものの、20 日以降、実験終了時まで直線的に増加することが示された。実験後半での分解率は、単独での加水分解試験の結果から得られた計算値（図 4、実線）より高くなり、最終的に 90%に達していた。これは、PLGA1000 と PLA3000 がすべて分解した場合の分解率（約 67%）を遙かに超えており、単独では加水分解が確認されなかった PLA6000 も分解、溶出していることを示している（結果 3-1、3-2）。ポリ乳酸の内部に乳酸の可溶性オリゴマーが蓄積する場合、このオリゴマーの末端カルボキシル基による自己触媒反応によって加水分解が促進することが知られており、本実験の場合も PLGA1000 の分解によって生じたオリゴマーが高分子量のポリ乳酸の加水分解を加速したと考えられる<sup>14)</sup>。単位時間あたりの有機物の溶出量は、20 日目以降変動はあるものの、実験が終了するまで高い値に維持されており、長期間、安定的に有機物の溶出が確認された。この結果は、複数のポリ乳酸を混合することで、長期間、安定的に有機物の溶出が可能となり、ポリ乳酸をエネルギー源としたバイオリクターにおいても、窒素除去活性の長期安定化を図ることができると考えられる。有機物の溶出量の変動については、複数のポリ乳酸を混合した場合の加水分解の挙動はその混合比に依存することが報告されており<sup>15)</sup>、混合するポリ乳酸の分子量や混合比などを変更することで、最適な条件にすることが可能であると思われる。

一方、ポリ乳酸の加水分解では、その進行に伴って急速に pH が低下し、最終的に 3 以下にまで低下した（図 2）。ポリ乳酸の加水分解によ

って有機酸である乳酸等を溶出するため、著しく溶液の pH を低下させる。実際にバイオリクターで用いる場合には、溶出した乳酸等は脱窒菌によって消費されるため、pH の低下はないと考えられる。しかし、バイオリクターの窒素除去速度を向上するために、過剰のエネルギー源の供給が必要となることから、pH の低下を制御することも考慮する必要がある。そこで、カルシウム塩であるリン酸三カルシウムをポリ乳酸に添加することにより、加水分解に伴う pH 低下の抑制を試みた。リン酸三カルシウムは、骨などの成分であり、食品添加物としても使用されており、溶解してもバイオリクターに固定化した微生物に対する毒性はほとんどないと考えられる。また、水に対する溶解度（約 25 mg/L）が非常に低いため、通常は溶解しないで、溶液中の pH の低下など環境の変化によって溶解し、その溶解に伴い pH の低下を抑制できるのではないかと期待された。リン酸三カルシウムを添加したポリ乳酸の加水分解を行ったところ、溶液のリン酸濃度はポリ乳酸の分解率の上昇に伴って高くなり、ポリ乳酸からの有機物の溶出に伴ってリン酸三カルシウムも溶解していることが示された。リン酸濃度が上昇している間は、TOC 濃度が上昇しても、溶液の pH は、ポリ乳酸のみの場合より高く維持されており、リン酸三カルシウムを添加することによって pH 低下をある程度抑えることができることを示している。しかし、リン酸三カルシウムを添加したポリ乳酸でも、pH は 4~5 程度には低下するため、実際にバイオリクターに用いた場合、ポリ乳酸からの分解物が過剰に蓄積する環境では微生物の活性を維持できるほどの効果はない可能性がある。

#### 4-2 ゲルに固定化した脱窒菌の脱窒活性

前報告では、脱窒菌とポリ乳酸を固定化した

高分子ゲルによって脱窒活性は確認されたものの、その速度（約  $0.3\text{g-N/day/m}^2$ ）は低いものであった<sup>7)</sup>。高分子ゲルに固定化した脱窒菌の窒素除去速度を向上するためには、使用するポリ乳酸量を増やし、ポリ乳酸からの有機物の溶出量を多くすることで可能となると考えられるが、前報告では、ポリ乳酸は脱窒菌と共に高分子ゲルに固定化しており、この方法ではポリ乳酸の固定化量（高分子ゲル  $1\text{g}$  あたり  $0.1\text{g}$  以下）を大きくできない<sup>7)</sup>。そこで、ポリ乳酸を固定化した後に微生物を固定化した高分子ゲルを重層、接触させる構造に変更し、高分子ゲルの単位重量あたりのポリ乳酸量は  $1\text{g}$ （バイアルあたり  $2\text{g}$ ）にまで増やして、脱窒活性を検討した。リン酸三カルシウムを添加したポリ乳酸をエネルギー源にした場合、ポリ乳酸の固定化量が大きくなるほど脱窒速度は高くなり、ポリ乳酸の固定化量を調節することで固定化された脱窒菌の脱窒活性を向上させることが可能であることが示された。ポリ乳酸の固定化量がバイアルあたり  $1\text{g}$  以上では、脱窒速度は、約  $1.2\text{g-N/day/m}^2$  でほぼ一定となった。これは、容量の小さいバイアル中でバッチ処理を行ったため、模擬排水交換後、翌日には硝酸が消費されていることが多く、実際の速度より低く計算されていると考えられる。また、結果は示さなかったが、模擬排水の TOC 濃度を測定したところ、交換直前の TOC 濃度はポリ乳酸の固定化量が多いほど高くなり、バイアルあたり  $2\text{g}$  固定化した実験では  $400\sim 3000\text{mg-C/L}$  程度の有機物の蓄積が検出された。これは、脱窒菌が利用できる可溶性の乳酸等はまだ十分にあることを示しており、実際には  $1.2\text{g-N/day/m}^2$  以上の処理能力を持っていた可能性が高い。

一方、ポリ乳酸のみをエネルギー源とした場合では、固定化量を変えても活性の向上は見られず、非常に低いままであった。模擬排水中の pH は、 $2\sim 4$  にまで低下する場合もあり、乳酸

などの溶出による pH の低下が考えられた。しかし、すべてのバッチ処理において pH が低下しているわけではなく、pH 低下以外の要因も考えられる。本実験で使用した模擬排水は、ポリ乳酸の加水分解による pH 変動を確認するために、リン酸塩を含まないものを使用している。リン酸は微生物の増殖に不可欠なものであり、本実験ではリン酸が不足していた可能性がある。リン酸三カルシウムを添加した場合には、ポリ乳酸の分解に伴って一部リン酸三カルシウムが溶解し、リン酸を供給していたと考えられる。実際の排水処理において、実験で使用する模擬排水の様に無機塩類が十分にあるとは限らないため、ポリ乳酸とともに他の無機塩を固定化して同時に供給することで脱窒菌またはアンモニア酸化菌の活性を高く維持することが可能となるかもしれない。

#### 4-3 ポリ乳酸をエネルギー源としたバイオリアクターの窒素除去能力の評価

3 種類のポリ乳酸とリン酸三カルシウムを混合したものをエネルギー源としたバイオリアクターを作製し、その窒素除去活性を 100 日間連続で検討した。実験開始から 20 日目まではアンモニアの減少は見られたものの、硝酸が蓄積し、総窒素濃度の減少は  $20\text{mg-N/L}$  程度であった。本実験では 3 種類のポリ乳酸を混合したものをを用いたため、初期の有機物の溶出が緩やかになり、脱窒菌の活性が低くなったと考えられる（結果 3-3）。これは、混合するポリ乳酸の混合比などを変更することで、バイオリアクターの初期の処理能力を改善することができると思われる。ポリ乳酸から溶出される有機物量が安定する 20 日目以降は、硝酸の蓄積は確認されるものの、総窒素濃度は順調に減少した。その窒素除去速度は、 $3\sim 4\text{g-N/day/m}^2$  と求められ、比較的高い

活性を実験終了時まで、すなわち 90 日間程度維持した。前報告のポリ乳酸を使用したバイオリアクターでは、その活性は約 0.9 g-N/day/m<sup>2</sup>であったことから、本実験で得られた窒素除去速度は、前報告の速度に比べ 3~5 倍程度活性が向上したことになる<sup>7)</sup>。また、従来のエタノールをエネルギー源とした場合 (5 g-N/day/m<sup>2</sup>) に比べても、同程度にまで窒素除去速度が向上し、排水処理などの適応にも十分可能な速度が得られたと考えられる<sup>3-5)</sup>。

本実験でバイオリアクターに使用したポリ乳酸量 (11.25g) から予想されるエネルギー源の供給量は、脱窒菌が 5 g-N/day/m<sup>2</sup> の速度で硝酸を還元するのに必要となるエネルギー源の理論値の約 10 倍量に相当し、模擬排水への過剰な有機物の溶出があったと考えられる。しかし、模擬排水の TOC 濃度は、実験期間中低い値で維持されており、ポリ乳酸からの可溶性の有機物は、微生物を固定化した膜状ゲルを通過して模擬排水に溶出していないことが示された。これは、模擬排水は常に通気することによって好気条件を保ってバッチ処理を行っていたことから、過剰に溶出した有機物は、ゲル内部で好氣的に消費されたと考えられる。

#### 4-4 生分解性プラスチックをエネルギー源としたバイオリアクターの適応について

窒素除去バイオリアクターに固定化している脱窒菌 (*P.denitrificans*) は、有機物や水素ガスなど様々なものを脱窒のエネルギー源として利用することができる。その性質を利用して、これまでにエタノール、メタノール、水素などをエネルギー源として用い、バイオリアクターによる窒素除去が可能であることを示してきた<sup>3-5)</sup>。発電所の排水処理へバイオリアクターを適応する場合、安価であること、また一般的な排

水の生物学的窒素処理にも使用されることから、エネルギー源としてエタノールやメタノールを中心に検討してきた。発電所に設置、試験を実施している大型の実証試験装置でも、エタノールやメタノール等の溶液を使用することを前提として設計が行われている<sup>8,9)</sup>。このような溶液をエネルギー源として用いるバイオリアクターでは、微生物を固定化した高分子ゲルのモジュール内部にエネルギー源を供給する必要がある (図 9)。そのため、各モジュールにエタノール供給用のラインや供給するためのポンプやタンクが必要となり、設備が複雑になりがちである。

一方、ポリ乳酸など生分解性プラスチックを使用した場合、徐放性のエネルギー源として高分子ゲルに固定化した脱窒菌に有機物を供給できる。そのため、微生物を固定化した高分子ゲルと生分解性プラスチックを一組にしたモジュールを作製することで、窒素除去活性を得ることが可能であり、エネルギー源を供給するための設備が不要となる (図 9)。このような特徴は、敷地面積などの点から新規処理施設の困難な発電所において既存の貯水槽や排水処理槽にモジュールのみを設置したり、発電所の点検時など時期が限定されている場合の一時的な対応などの場面に適応するには、有効であると考えられる。また、微生物を固定化した高分子ゲルと生分解性プラスチックを一組にしたモジュールは、それ自身で窒素除去活性を示すので、モジュールそのものを小型化、使い捨てにすることが可能である。これは、工業排水の処理以外にも家庭用などの水棲生物の水質維持など、バイオリアクターの適応範囲を拡げることを可能にすると考えられる。

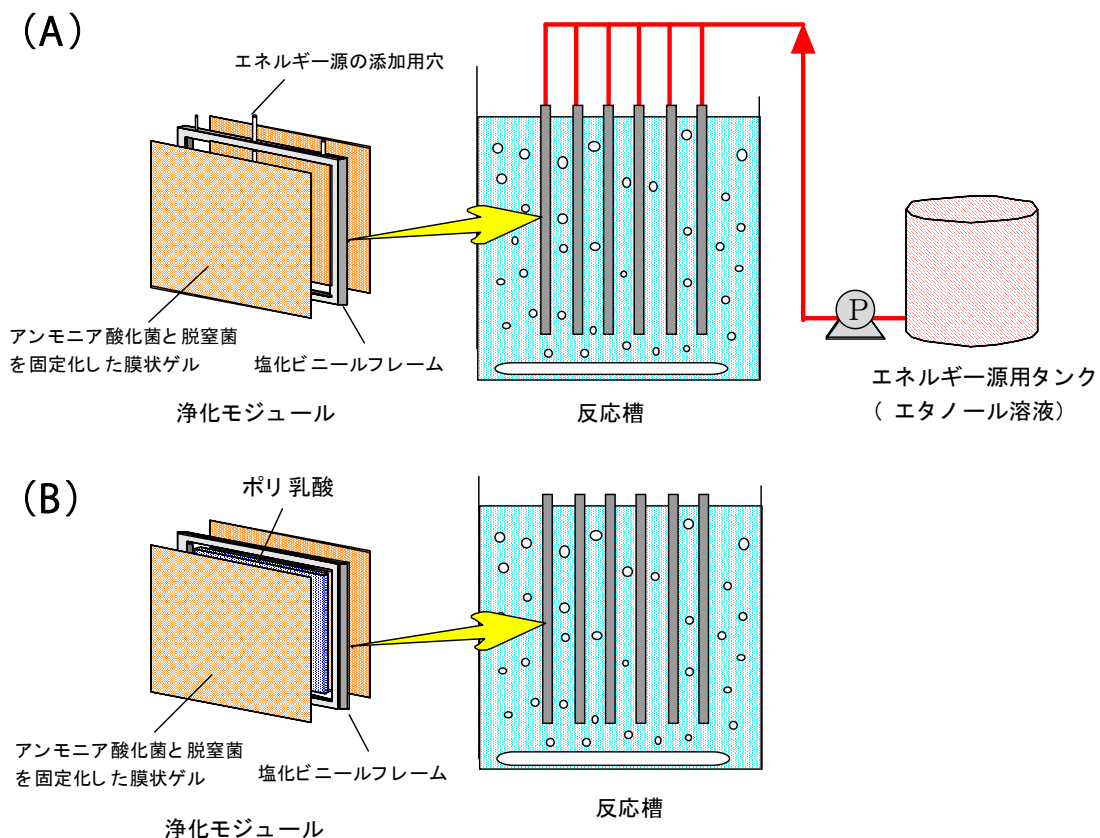


図9 エタノール溶液(A)および生分解性プラスチック(B)をエネルギー源とした窒素除去バイオリアクターの概念図

## 5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、ポリ乳酸のサンプルを合成、提供して頂きました多木化学(株) 研究所岡田隆雄氏をはじめ有機材料グループの方々に感謝の意を表す。また、微生物の培養、分析操作などにご協力を頂いた(株)セレスの北澤奈穂氏に感謝の意を表す。最後に、本報告書の校閲を頂いた当所、バイオテクノロジー領域の佐々木和裕氏、平野伸一氏に感謝の意を表す。

## 6. 参考文献

- (1) 阿部晶：公害と対策, 27, 810-816 1991
- (2) 柳下正治：公害と対策, 29, 718-727 1993
- (3) 植本弘明、斎木博：排水中の窒素除去に関する研究 1., 電力中央研究所報告, U94035, (1994)
- (4) 植本弘明、斎木博：排水中の窒素除去に関する研究 3., 電力中央研究所報告, U96032, (1997)
- (5) 植本弘明、斎木博：排水中の窒素除去に関する研究 4., 電力中央研究所報告, U97094, (1998)
- (6) 植本弘明、渡邊淳、森田仁彦、斎木博：排水中の窒素除去に関する研究 6., 電力中央研究所報告, U01010, (2001)
- (7) 渡邊淳、植本弘明、斎木博：排水中の窒素除去に関する研究 7., 電力中央研究所

- 報告, U01015, (2001)
- (8) 森田仁彦、植本弘明、渡邊淳、斎木博、斎藤一郎、松木芳行、吉井友彦：排水中の窒素除去に関する研究 8., 電力中央研究所報告, U02031, (2003)
- (9) 森田仁彦、植本弘明、渡邊淳、斎藤一郎、松木芳行、吉井友彦：排水中の窒素除去に関する研究 9., 電力中央研究所報告, V04003, (2004)
- (10) 生分解性プラスチック研究会編：生分解性プラスチックハンドブック 株式会社エヌティーエス
- (11) 辻秀人、筏義人：ポリ乳酸 高分子刊行会
- (12) R. Bodmeier et al. : The effect of the addition of low molecular weight poly(dl-lactide) on drug release from biodegradable poly(dl-lactide) drug delivery systems., *Int. J. Pharm.*, 51, 1(1989)
- (13) M. Asano et al. : In vivo controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist from poly(-lactic acid) formulations of varying degradation pattern., *Int. J. Pharm.*, 67, 67(1991)
- (14) C. G. Pitt and Z. Gu : Modification of the rates of chain cleavage of poly(-caprolactone) and related polyesters in the solid state., *J. Controlled Release*, 4, 283(1987)
- (15) J. Mauduit et al. : Hydrolytic degradation of films prepared from blends of high and low molecular weight poly(DL-lactic acid)s., *J. Biomed. Mater. Res.*, 30, 201(1996)

---

電力中央研究所報告

[不許複製]

編集・発行人

財団法人 電力中央研究所  
環境科学研究所



千葉県我孫子市我孫子 1646  
電話 04 (7182) 1181 (代)

e-mail [esrl-rr-ml@criepi.denken.or.jp](mailto:esrl-rr-ml@criepi.denken.or.jp)

---

発行所

財団法人 電力中央研究所  
東京都千代田区大手町 1-6-1  
電話 03 (3201) 6601 (代)

---

印刷所

株式会社 ユウワビジネス  
東京都千代田区神田須田町 1-1  
電話 03 (3258) 9380

---

ISBN4-902706-76-8

