

光硬化性樹脂プレポリマーを用いる 脱窒菌の固定化に関する研究

岡山大学医学部細菌学教室 (指導: 金政泰弘教授)

板 谷 勉

(平成3年8月27日受稿)

Key words: 脱窒菌, 固定化, 脱窒素, 排水処理

緒 言

現在, 排水処理の主流に用いられている活性汚泥法, 回転円板法, あるいは浸積ろ床法は, 処理槽内で自然に増殖する生物, 微生物を利用する生物処理方式である。これらの処理方式では多種類の微生物によって構成された生態形が形成され¹⁾²⁾, 生物学的には望ましい状態であるけれども, 期待される種の個体数は少なく, 特定の活性についてみれば全体量の割には活性が低いと推定される。また, 自然に増殖する微生物膜やフロックを利用しているため, 環境条件によってそれらの増殖あるいは構成が大きく変動し, 処理機能に多大の影響をおよぼす。その結果, 安定な処理水を得ることが必ずしも容易ではない。

これに対し, 高分子ゲル等に特定の活性を有する微生物を閉じ込め, この微生物活性を利用するいわゆる微生物固定化法は, 微生物濃度を $10^9 \sim 10^{10}$ 個/mlゲルまで高めることが可能であり³⁾⁴⁾, また, 排水処理施設での重要な課題である微生物と処理水の分離を容易に行いうること, あるいは有用細菌の洗いだしが防止できること等種々の利点を有するものと考えられる。

固定化酵素, 固定化微生物の利用は, 医薬品製造分野あるいは食品工業の分野で広く研究され, 実用化されているものも少なくない⁴⁾。

一方, 排水処理の分野においては, 固定化活性汚泥を用いる排水中の有機物除去⁵⁾⁶⁾, バイオガス回収による再資源化をめざす固定化メタン細菌の研究等がある^{7)~10)}。また, 窒素除去に関

連したものとしては, 固定化 *Nitrosomonas europaea*¹¹⁾¹²⁾を用いるアンモニアの酸化, *Pseudomonas denitrificans*¹³⁾¹⁴⁾, *Micrococcus denitrificans*¹⁵⁾, *Bacillus firmus*¹⁶⁾及び *Alcaligenes* sp¹⁶⁾¹⁷⁾の固定化と脱窒の基礎実験を始めとする色々な研究がある。

固定化担体としては, カラギーナン, アルギン酸等の天然高分子からポリアクリルアミド, ポバール等の合成高分子, またはセラミック等の無機物質まで, きわめて多くの種類が使用されている。さらに固定化方法についても, 担体結合法, 包括法等様々な方法が研究されている。特に近年, 固定化操作が比較的簡易であり, 酵素や微生物に対する影響が少ない等の理由から, 固定化担体として, 光硬化性プレポリマーあるいはウレタンプレポリマーのようなプレポリマー担体を用いる固定化の方法が研究され注目されてきた¹⁸⁾¹⁹⁾。

著者は, 水域の富栄養化防止と現行の排水処理機能の効率化の観点から, 活性汚泥からの脱窒菌分離株を用い, その排水処理への応用のための固定化脱窒菌の作成と, 固定化脱窒菌の機能及び環境条件の活性に与える影響について検討した。固定化担体としては光硬化性樹脂プレポリマーを用いた。さらに, 尿尿単独処理浄化槽2次処理水を原水として用いた脱窒除去連続処理実験を行い, 排水処理への適用性についても検討を行った。

実験材料及び実験方法

1. 供試脱窒菌株

供試脱窒菌株は、尿尿単独処理浄化槽から分離したものである。本細菌はグラム陰性の短桿菌で、その生物性状は Table 1 に示すごとくであり、*Alcaligenes* 属菌であると考えられた。また、本細菌は、5~10℃の低温においても硝酸塩液体培地 (Difco 製, Nitrate broth) 中で増殖し、ガスを生成すると同時に硝酸態窒素 (NO₃-N) 及び亜硝酸態窒素 (NO₂-N) を消費した。

2. 脱窒菌生成ガスの分析

供試菌株が生成するガスが窒素ガスであることを確認するため、上記菌株を硝酸塩液体培地中で30℃一晚培養し、生成したガスの組成をガスクロマトグラフ質量分析装置 (島津製作所製 LKB-9000) を用いて調べた。3 mmφ×1.0mのカラムに30~60メッシュのモレキュラーシーブ 5 A を充填し、キャリアーガスとして He を用い、流速は18ml/分、カラム温度50℃、セパレーター温度250℃、イオン原温度290℃、イオン化

Table 1 Characteristics of the denitrifying bacterium

Characteristics	
Catalse	+
Oxydase	+
OF test	-
Motility	+
Pigment	-
Acid production from	
Glucose	-
Lactose	-
Sucrose	-
Maltose	-
Fructose	-
Rafinose	-
Mannitol	-
Growth on Simmon's citrate agar	+
Geratin liquefaction	-
Urease	-
Phenylalanine deaminase	+
H ₂ S production	-

エネルギー70 eV, トラップ電流60 μA の条件で分析した。

3. 脱窒菌液の調製

固定化脱窒菌ゲルの作製に使用した脱窒菌懸濁液は、以下の方法で調製した。即ち、上記脱窒菌株を硝酸塩液体培地中で30℃、2日間静置培養後、培養液を4℃、8,500×g 10分間遠心分離し、集菌した。集菌菌体は0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.0 で2回洗浄したのち、同緩衝液に懸濁 (200mg湿重量/ml) し、以下の実験に用いた。

4. 脱窒菌の固定化

固定化に用いた光硬化性樹脂プレポリマー ENTG-3800は関西ペイント製で、主としてポリエチレングリコールあるいはポリプロピレングリコールを骨格として両末端に光硬化性の不飽和基を導入したものである。光硬化性樹脂プレポリマー、脱窒菌懸濁液 (約200mg湿重量/ml) 及び重合開始剤を重量比10:6:0.08の割合に混合した後、厚さ1mm枠のガラス平板 (20cm×35cm) 上に流し、ガラス平板上20cmの位置から10分間、ケミカルランプにより360~370 nm の波長光照射を行い、プレポリマーを重合することにより固定化脱窒菌ゲルを得た。作製した固定化脱窒菌ゲルは、0.05 M リン酸緩衝液で十分洗浄した後5mm角に切りそろえ、以下の実験に使用した。

5. 固定化脱窒菌の脱窒活性の回復

光硬化性樹脂ポリマーを用いて作成した固定化脱窒菌ゲルは、作製当初、プレポリマーや重合開始剤等の影響によりその脱窒活性が大きく低下した。しかし、硝酸塩液体培地中、30℃で一昼夜培養することによって脱窒活性の回復が認められた。従って、以後の実験にはゲル作製後硝酸塩液体培地中で30℃一晚培養し活性の回復したゲルを用いた。

6. 脱窒活性の測定

固定化脱窒菌と浮遊脱窒菌について測定を行った。特に記さない限り、固定化菌体の場合は、30℃の恒温水槽中200ml容メスシリンダー内の反応液 (5 mM 亜硝酸カリウムまたは硝酸カリウム, 10 mM 酢酸ナトリウム, 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0) 100ml中に固定化脱窒菌ゲルを10グラム加え反応を開始した。反応開始後各時間ご

とに反応液 2 ml を採取し、80℃ 3 分間の加熱処理により反応を停止した後、柳本製微量窒素分析装置 TN-7 により総窒素濃度を測定した。浮遊菌体の場合は、固定化菌体と同様に 100 ml の上記反応液に脱窒菌懸濁液 10 ml (湿重量約 200 mg) を添加し反応を開始したのち、各時間ごとに 2 ml ずつ反応液を採取し、ただちに反応停止液 (1 M 酢酸亜鉛 + 濃塩酸, 10 : 1) を 0.1 ml 添加し、遠心分離 (7,000 × g, 10 分間) によって上澄液を得て総窒素の分析を行った。脱窒活性は反応液中の総窒素濃度の減少から求めた。なお、反応系を嫌気状態にするため、反応開始前 30 分から反応液中に窒素ガスの通気を開始し、活性測定終了時まで続行した。

7. 固定化脱窒菌の脱窒活性に及ぼす水素供与体の影響

水素供与体の種類によって、脱窒菌の脱窒活性は大きく変動すると言われている¹⁷⁾²⁰⁾。そこで、排水処理施設の脱窒素処理時によく用いられているメタノール、脱窒菌の資化性の高いクエン酸三ナトリウム、酢酸ナトリウム及び生活排水中の成分として粉石鹼 (ミヨシ油脂製粉石鹼) の 4 種類を選んで、固定化脱窒菌の示す脱窒活性を測定、比較した。即ち、5 mM 硝酸カリウムを基質とし、各々 420 mg/l の 4 種類の水素供与体を含む反応液 100 ml に固定化脱窒菌ゲル 10 g を加え反応を開始した。反応開始各 0, 1, 2, 4, 6 時間後反応液 2 ml を採取し反応液中の総窒素濃度を測定し、脱窒活性に及ぼすこれら水素供与体の影響を比較検討した。

8. 固定化脱窒菌のゲル量と脱窒活性

5 mM 硝酸カリウムを基質に、10 mM 酢酸ナトリウムを水素供与体を含む反応液 100 ml に固定化脱窒菌のゲルを 1, 3, 6, 9, 15, 18 g ずつ添加し 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 時間後の反応液中の総窒素濃度を測定し、固定化菌体のゲル量と活性の関係を調べた。

9. 固定化脱窒菌の脱窒活性に及ぼす環境要因

固定化脱窒菌の活性は、環境要因に影響されるので pH、水温および有機物濃度を種々変化させ、2 時間反応させた後、反応液中の総窒素濃度を測定し、活性に対するこれら要因の影響を検討した。

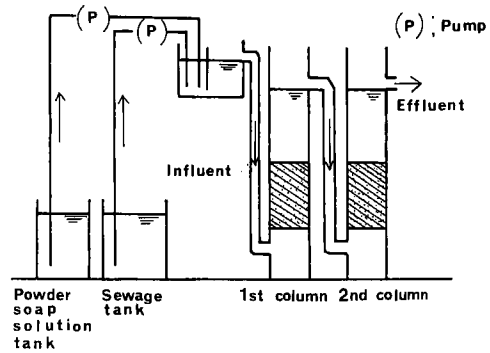


Fig. 1 Apparatus for columnar denitrification from the secondary treated effluent of waste using immobilized denitrifying bacteria.

Powder soap solution was added as a hydrogen donor and its final concentration was 70 mg/l.

Table 2 Operational condition of experimental apparatus

	1st column	2nd column
Column volume (ml)	261	261
Packed gel weight (g)	30	30
Retention time (hr)	1	1

10. 固定化脱窒菌を用いる実排水処理実験

Fig. 1 に示す実験装置を用い、尿尿単独浄化槽 2 次処理水を原水とした窒素除去実験を行い固定化脱窒菌ゲルの実排水への適用性について検討をした。本装置は、第 1 及び第 2 の 2 本の固定化脱窒菌充填カラムを有し、Table 2 の条件で運転した。その際、原水として 2 次処理水を用いたため水素供与体が不足しており、これを補うため石鹼水溶液を石鹼の最終濃度が 70 mg/l となるように添加した。なお、50 日間の実験期間中の水温は 17.5℃ から 25.5℃ であった。

実験結果

1. 脱窒菌生成ガスの分析

供試脱窒菌は、硝酸塩及び有機物が存在すると、嫌気条件下で活発に増殖しガスを生成する。そこで、本菌株を硝酸塩液体培地中で 30℃ 一昼夜培養した後、生成ガスの組成を分析した。このガスは GC/MS により分子イオンピークの m/

e が28であること及び空気ガスの窒素ピークとも一致したことから窒素ガスであることが判明した。

2. 水素供与体の種類と脱窒活性

KNO_3 を基質とした時の、水素供与体別の固定化脱窒菌ゲルの脱窒活性を Fig. 2 に示した。用いた水素供与体のうち最も高い活性を示したのは、酢酸ナトリウムであり、次いで石鹼であった。クエン酸三ナトリウムは水素供与体として働くもの前二者に比較して劣っていた。汚水処理に用いられる、メタノールはほとんど活性を示さなかった。そこで、ゲル量と脱窒活性の関係及び環境条件と脱窒活性の関係の検討には活性の最も高かった酢酸ナトリウムを水素供与体として用いることとした。また、生活排水中の成分である粉石鹼も水素供与体として利用できることが判明したので、実排水処理実験のための水素供与体の補給には石鹼をもちいた。

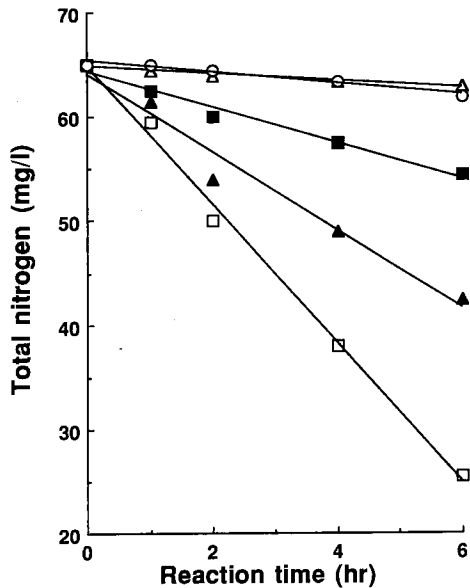


Fig. 2 Effect of Various hydrogen donor on denitrifying activity of immobilized cells.

KNO_3 was used as a substrate. Hydrogen donors were supplemented with 420 mg/l.

Hydrogen donor : Δ ; methanol, \blacksquare ; sodium citrate, \blacktriangle ; powder soap, \square ; sodium acetate, \circ ; water as a blank

3. 固定化脱窒菌ゲル量と脱窒活性

固定化脱窒菌ゲルのゲル量と活性の関係を検討した結果を Fig. 3 に示した。固定化脱窒菌ゲルが1.0 g から18.0 g と増加するにつれて脱窒活性は上昇し、著者の使用したゲル量の範囲内ではゲル量と初期速度の間には平行性があった。このことから、固定化脱窒菌が脱窒活性に直接かかわっていることが明らかとなった。

4. 固定化脱窒菌の脱窒活性と pH の関係

KNO_2 または KNO_3 を基質とした場合の、固定化脱窒菌及び浮遊脱窒菌の種々の pH 域で脱窒活性を Fig. 4 に示した。基質として亜硝酸塩を用いた場合の脱窒活性の至適 pH は固定化菌体、浮遊菌体ともに7.0で両者に差はなかった。しかし、固定化菌体の脱窒活性は浮遊菌体よりアルカリ側でやや高かった。また、硝酸塩を基質とした場合も固定化菌体、浮遊菌体の両者の至適 pH は7.5で差は認められなかった。さらに、亜硝酸塩を基質とした場合と同様に、アルカリ側において固定化菌体の方が浮遊菌体に比較し

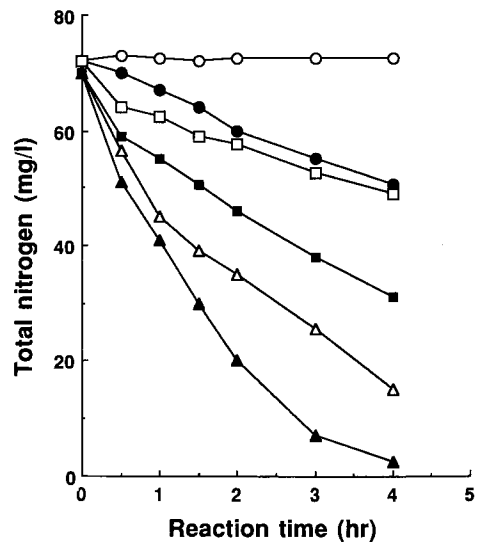


Fig. 3 Relationship between denitrifying activity and the amount of immobilized gel.

KNO_3 was used as a substrate and sodium acetate was used as a hydrogen donor.

The amount of gel : \circ ; 1.0 g, \bullet ; 3.0 g, \square ; 6.0 g, \blacksquare ; 9.0 g, \triangle ; 15.0 g, \blacktriangle ; 18.0 g

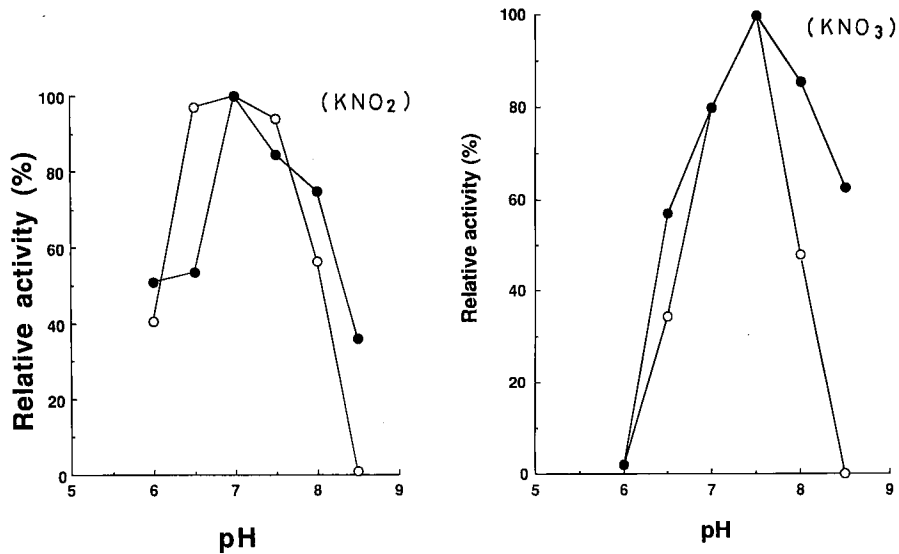


Fig. 4 Effect of pH on denitrifying activity of free and immobilized cells. Phosphate buffer was used for adjusting pH. KNO_2 (left) or KNO_3 (right) was used as a substrate and sodium acetate was used as a hydrogen donor. ● ; immobilized cells, ○ ; free cells

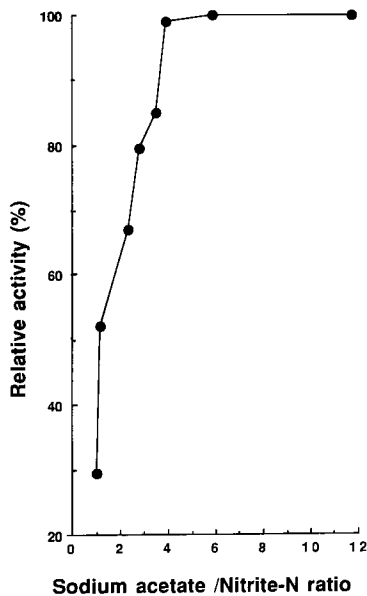


Fig. 5 Effect of CH_3COONa/NO_2-N ratio on denitrifying activity of immobilized cells. KNO_2 was used as a substrate and sodium acetate was used as a hydrogen donor.

てやや高い活性を示した。以上のごとく、脱窒菌が脱窒活性を示す pH 範囲が固定化することによって広がる傾向にあった。

5. 脱窒活性に及ぼす有機物/ NO_x-N 比の関係

亜硝酸カリウムまたは硝酸カリウムを基質とした場合の、固定化脱窒菌ゲルの脱窒活性と酢酸ナトリウム/ NO_x-N 比との関係を Fig. 5 及び Fig. 6 に示した。亜硝酸塩を基質とした場合、脱窒活性は酢酸ナトリウム/ NO_2-N 比が約 4 までの時には直線的に増加し、これ以上水素供与体として酢酸ナトリウムを加えても脱窒活性は変化しなかった。同様に硝酸塩を基質にした場合の脱窒活性は、酢酸ナトリウム/ NO_3-N 比が 5 までは直線的増加を示し、それ以上では横ばいに変化しなかった。この値を BOD 換算すると、本ゲルを用いた場合の最大脱窒活性を得るための有機物量は亜硝酸塩を基質とした場合には、 BOD/NO_2-N が 2 以上であり、硝酸塩を基質にした場合には、 BOD/NO_3-N が 2.5 以上となった。

6. 脱窒活性と温度の関係

硝酸カリウムを基質とした場合の、固定化脱

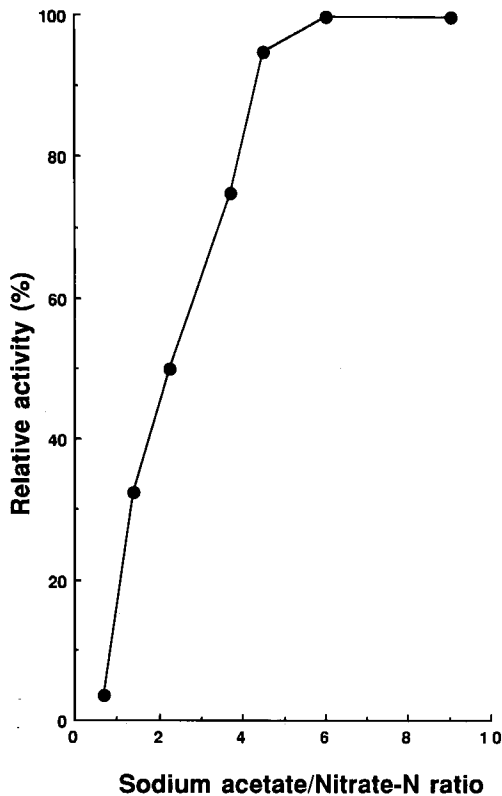


Fig. 6 Effect of $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{NO}_3\text{-N}$ ratio on denitrifying activity of immobilized cells. KNO_3 was used as a substrate and sodium acetate was used as a hydrogen donor.

窒菌と浮遊脱窒菌の脱窒活性と温度の関係を Fig. 7 に示した。脱窒活性は $30^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ でほぼ最大に達し温度の低下と共に脱窒活性も低下した。 10°C において浮遊菌体及び固定化菌体はそれぞれ、最大活性の20%及び60%の活性を保持していた。即ち、固定化することによって低温化での脱窒菌の脱窒活性を高く保つことができるものと推定された。

7. 固定化脱窒菌カラムを用いた、尿管単独浄化槽2次処理水中の窒素除去

固定化脱窒菌ゲルの実排水への適用性について検討した結果は、Fig. 8 に示した。尿管単独浄化槽の2次処理水を原水として用いたため、総窒素濃度が大きく変動しているものの、運転開始後の20日間はほぼ90%の脱窒率を示した。

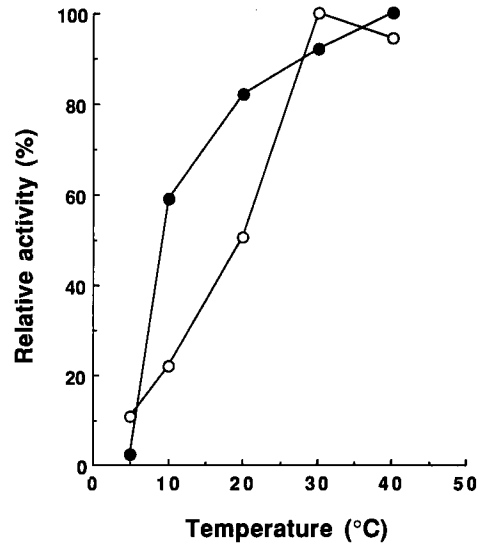


Fig. 7 Effect of temperature on denitrifying activity of free and immobilized cells. KNO_3 was used as a substrate and sodium acetate was used as a hydrogen donor.
● ; immobilized cells, ○ ; free cells

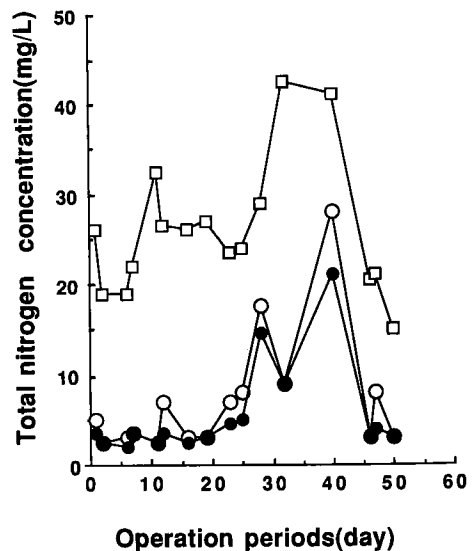


Fig. 8 Total nitrogen removal from the secondary treated effluent of waste using immobilized denitrifying bacterial cells.
□ ; influent, ○ ; the first column effluent, ● ; the second column effluent

その後は流入水中の Org-N, $\text{NH}_3\text{-N}$ の上昇により総窒素除去率は低下したものの, $\text{NO}_2\text{-N}$ 及び $\text{NO}_3\text{-N}$ 等の酸化態窒素は完全に除去されていた。このことから, 固定化脱窒菌ゲルを実際の排水処理に応用することが可能であると推定された。

考 察

排水処理施設において生活排水中の窒素除去効率を高めるためには, 1) 処理槽内に脱窒菌等窒素除去有用細菌が高濃度に保持されていること, 2) 保持されている有用細菌の活性が高いこと, 3) 保持されている有用細菌が高い活性を示す環境であること等の諸条件を満たす必要がある。

このような観点から, 窒素除去有用細菌である脱窒菌を合成高分子ポリマーである光硬化性樹脂ポリマー中に固定化した。今回用いた固定化方法によると, 至適 pH は変化しなかったけれども, 脱窒活性はアルカリ側で固定化菌体のほうが高かった。即ち, 脱窒菌が示す高い脱窒活性の pH 域が幾分広くなった。また, 固定化することによって低水温下での活性が, 固定化していない遊離の脱窒菌の活性より高く保持されていた。一般に, 微生物を固定化すると, その至適 pH が移動したり¹⁵⁾²³⁾, pH-活性曲線が幅広くなるという報告が多く¹⁸⁾²¹⁾²⁴⁾, 固定化することによって微生物が外部の環境から保護される可能性がある。これらの効果が, 固定化脱窒菌ゲルを用いた実排水中の窒素除去連続実験においてあらわれ, 安定した窒素除去が得られたものと推定される。

pH, 水温, 有機物量などは排水処理施設の処理機能に大きな影響を及ぼす要因である。これらは排水処理の主役である微生物の活性に大きな影響を及ぼす要因であり, このうち水温は, 通常の排水処理の場合は制御できない。従って, 夏以外の季節で高い活性を発現, 維持するためには, 低水温下でも比較的高い活性を示す菌株を処理施設で高濃度に維持する必要がある。このような観点から低温で活性の高い微生物を固定化することは, 有効な手段となると考えられる。また, 排水処理においては, pH の制御が施設管

理上の重要なポイントの一つである。特に, 硝化の進行に伴う酸性側への移行が大きな障害となる。

今回の実験においては, 低 pH 域での活性の点からは固定化の効果が認められなかった。従って, 低 pH 域で高い活性を示す脱窒菌種を選択し, 低 pH 域での活性低下を保護するような担体及び固定化法を選定することによって, 更に高い脱窒機能を有する固定化脱窒菌を作成することが可能と考えられる。

脱窒菌が脱窒活性を示すためには, 基質である酸化態窒素とともに電子供与体となる有機物が必要である。排水処理施設においては曝気槽内での好気処理による酸化態窒素の生成時に, 共存する有機物酸化細菌により有機物が消費される。その結果, 後続の嫌気処理による脱窒処理時に脱窒菌に対する電子供与体としての有機物がしばしば不足し, 脱窒処理が不十分となることが多い。このため脱窒処理槽内に外部から有機物を補給する機会が多い。したがって, 脱窒菌が最大の脱窒活性を示す時の酸化態窒素と有機物の割合を求めておくことによって, 外部から有機物を補給する場合に過剰の有機物補給を防止でき, 省資源となることはもちろんのこと, 過剰の有機物による BOD の上昇を防止できる。

酢酸ナトリウムを電子供与体とした本実験では, 固定化脱窒菌ゲルが最大の脱窒活性を得る際の最小の酢酸ナトリウム/ $\text{NO}_x\text{-N}$ 比の値は 4 ($\text{NO}_2\text{-N}$), 5 ($\text{NO}_3\text{-N}$), BOD 換算すると 2.0 ($\text{NO}_2\text{-N}$), 2.5 ($\text{NO}_3\text{-N}$) であった。Narkis²²⁾らは, 脱窒率と有機物の関係を求め, C/N 比(酢酸ナトリウム/ $\text{NO}_x\text{-N}$)の値が 4.6 の時 100% の脱窒が得られたと報告した。また, BOD/ $\text{NO}_x\text{-N}$ 比が 2.3 で 100% の脱窒が行われ, この値は用いた水素供与体であるメタノール, 酢酸ナトリウム, 凝集沈澱処理した生下水に関係なく一定であったと報告している。これらの結果から, 本固定化脱窒菌を用いて脱窒処理する場合には, 溶存酸素の影響や菌体増殖あるいは他の有機物分解菌による消費を考慮して水素供与体として, $\text{NO}_x\text{-N}$ 量の 3 倍から 4 倍程度 BOD が存在すれば, 最大の脱窒活性及び脱窒率が得られるこ

とが判明した。また、通常の排水処理施設において脱窒処理時の有機炭素源として用いられるメタノールが、本菌株に対しては水素供与体とならず、酢酸ナトリウム及び粉石鹼の方が有効であったことから本菌株はメタノール添加の脱窒処理システムの汚泥中に優先する菌種とは異なったものであることが示唆された。

結 論

尿管浄化槽から分離した脱窒菌株を用いて、固定化脱窒菌と浮遊脱窒菌の脱窒活性を比較検討し、さらに尿管単独2次処理水に70mg/lの石鹼を添加した水を原水とした窒素除去連続実験を行った。その結果、以下の成績を得た。

1. 水素供与体として、4種類用いたが、その中で酢酸ナトリウムが最適であり、生活排水中の成分である石鹼も有効であった。メタノールは水素供与体として有効でなかった。

2. 固定化により脱窒活性の低下があるが、硝酸塩あるいは亜硝酸塩を含む培養液で短期間のうちに回復した。

3. 固定化菌体の脱窒活性は亜硝酸塩を基質とした時7.0、硝酸塩を基質とした時7.5でピークを示した。また、固定化菌体の脱窒活性は、

浮遊菌体に比べてアルカリ側でやや高かった。

4. 固定化菌体の脱窒活性は30℃から40℃で最高に達し、浮遊菌体に比較して低温において高く保持されていた。

5. 固定化脱窒菌が最大活性を得るのに必要な最少の酢酸ナトリウム/NO_x-N比の値は、亜硝酸塩を基質とした場合に、それぞれが4 (BOD/NO₂-N = 2) 及び5 (BOD/NO₃-N = 3) であった。

6. 70mg/lの石鹼を添加した尿管単独浄化槽2次処理水を用いた窒素除去連続処理実験の結果、排水処理適用への可能性が示唆された。

今後、長期にわたる実排水連続処理実験や、さらに実用性の高い担体及び固定化法の模索、より高い活性と安定性を持った菌株の探索を行っていく事は勿論、活性汚泥の中に特定の機能をもった微生物を添加して活性を高めるための、混合微生物群固定化の検討が重要であると考えられた。

稿を終えるに当たり、御懇徳なるご指導と御校閲をいただいた岡山大医学部細菌学教室金政泰弘教授に深謝します。

文 献

- 1) 津田松苗：污水生物学，北隆館，東京（1964）pp 162—238.
- 2) 須藤隆一：排水処理と微生物；環境と微生物，都留信也編著，共立出版，東京（1979）pp 1—56.
- 3) Wada M, Kato J and Chibata I: A new immobilization of microbial cells. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* (1979) **8**, 241—247.
- 4) 千畑一郎，土佐哲也：固定化酵素及び固定化微生物について，有機合成化学協会誌（1978）第36巻，第11号，917—930.
- 5) 橋本 奨，古川憲治，濱 宏：活性汚泥の固定化とその浄化機能に関する研究——PVA凍結法について——，下水道協会誌（1986）Vol. 23, No. 261, 16—22.
- 6) 橋本 奨，古川憲治，濱 宏：活性汚泥の固定化とその浄化機能に関する研究——PVAホウ酸法について——，下水道協会誌（1986）Vol. 23, No. 262, 41—47.
- 7) Messing R A: Immobilized microbes and a high-rate, continuous waste processor for the production of high butyric acid and the reduction of pollutants. *Biotechnol Bioeng* (1982) **24**, 1115—1123.
- 8) Karube I, Kuriyama S, Matunaga T and Suzuki S: Methane production from wastewaters by immobilized methanogenic bacteria. *Biotechnol Bioeng* (1980) **22**, 847—857.
- 9) Beppu T, Anazawa H and Saiki T: Studies on methane fermentation at high temperature. Report of special project research on energy and a grant in aid of scientific research of ministry of education

- science, Japan (1983) 255—260.
- 10) Scherer P : Immobilization of the methanogenic bacterium *Methanosarcina barkeri*. Biotechnol Bioeng (1981) **23**, 1057—1065.
 - 11) Kokufuta E, Matsumoto W and Nakamura I : Immobilization of *Nitrosomonas europaea* cells with polyelectrolyte complex. Biotechnol Bioeng (1982) **24**, 1591—1603.
 - 12) van Ginkel C G, Trammer J, Luyben K Ch A M and Klapwijk : Characterization of *Nitrosomonas europaea* immobilized in calcium alginate. Enzyme Microb Technol (1983) **5**, 297—303.
 - 13) Nilson I, Ohlson S, Hangstrom L, Molin N and Mosbach K : Denitrification of water using immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells. Eur J Appl Microbiol Biotechnol (1980) **10**, 261—274.
 - 14) Nilsson I and Ohlson S : Columnar denitrification of water by immobilized *Pseudomonas denitrificans*. Eur J Appl Microbiol Biotechnol (1982) **14**, 86—90.
 - 15) Mohan R R and Li N N : Nitrate and nitrite reduction by liquid membrane-encapsulated whole cells. Biotechnol Bioeng (1975) **17**, 1137—1156.
 - 16) 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) —— 脱窒菌固定化の試み ——. 下水道協会誌 (1983) Vol. 20, No. 234, 31—36.
 - 17) 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 (1984) Vol. 21, No. 236, 1—11.
 - 18) Omata T, Iida T, Tanaka A and Fukui S : Transformation of steroids by gel-entrapped *Nocardia rhodocrous* cells in organic solvent. Eur J Appl Microbiol Biotechnol (1979) **8**, 143—155.
 - 19) Omata T, Tanaka A, Yamane T and Fukui S : immobilization of microbial cells and enzymes with hydrophobic photocrosslinkable resin prepolymers. Eur J Appl Microbiol Biotechnol (1979) **6**, 207—215.
 - 20) 遠矢泰典 : 生物学的脱窒法に関する研究(III) —— 活性汚泥の脱窒機能および有機炭素源に関する研究. 下水道協会誌 (1970) Vol. 7, No. 76, 23—39.
 - 21) Chibata I, Tosa T and Sato T : Immobilized aspartase-containing microbial cells, Preparation and enzymatic properties. Appl Microbiol (1974) **27**, 878—885.
 - 22) Narkis N, Rebuhn M and Sheindorf Ch : Denitrification at various carbon to nitrogen ratios. Water Research (1979) **13**, 93—98.
 - 23) Hamada T, Sugisita M, and Motai H : Continuous production of 4-ethylguaiacol by immobilized cells of salt-tolerant *Candida versatis* in an air lift reactor. Journal of fermentation and bioengineering (1990) **69**, 166—169.
 - 24) Fukushima Y and Motai H : Continous conversion of glutamine to glutamate by immobilized glutaminase-producing yeast. Journal of fementation and bioengineering (1990) **69**, 189—191.

Immobilization of denitrifying bacteria using photo-crosslinkable resin prepolymer and some of its properties

Tsutomu ITADANI

Department of Microbiology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

The denitrifiers isolated from the activated sludge of night soil treatment plant were immobilized using a photo-crosslinkable resin prepolymer.

Denitrifying activity was strongly inhibited during the first period but the activity was increased in the medium containing nitrate and recovered after 1 day. Acetate was an effective hydrogen source and soap was also effective. Methanol could not serve as a hydrogen source. The optimum pH for denitrification by the immobilized bacteria was 7.0 for nitrite and 7.5 for nitrate, and the optimum temperature ranged 30°C to 40°C. The lowest $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{NO}_x\text{-N}$ ratio necessary for getting the highest activity was 4 for nitrite ($\text{BOD}/\text{NO}_2\text{-N}=2$) and 5 for nitrate ($\text{BOD}/\text{NO}_3\text{-N}=2.5$).

Photo-crosslinkable resin prepolymer gels exhibited stable denitrification activity to the secondarily treated sewage contained 70_{mg}/l of soap.