

(62) 膜光触媒による藻類及び光合成細菌付着の抑制に及ぼす透過光の影響

Effect of thin film photocatalysis on light penetration by control of algal and photosynthetic bacterial adhesion

洪 静蘭*、大瀧雅寛*

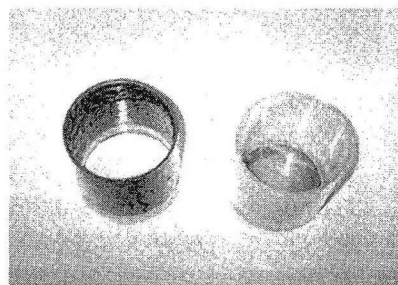
Jinglan HONG*, Masahiro OTAKI*

ABSTRACT: In decolorization treatment of dye-wastewater by photosynthetic bacteria with visible light irradiation, excessive algal growth and adhesion on the wall of reactor caused a severe problem such as filter-clogging and low light penetration in reactor. In this study, the effect of thin film photocatalysis on adhesion of algal or photosynthetic bacteria was investigated. The adhesion of algae and photosynthetic bacteria could be controlled by photocatalytic reaction with UV and UV+FL irradiation, whereas it could not be controlled by surface property of TiO_2 . Moreover, inactivation mechanism by TiO_2 on algae was observed by microscopy using of *Chroococcus* sp. as probe. It was suggested that *Chroococcus* sp. cells were activated by TiO_2 and the nonspecific effects of membrane depolarization was enhanced. Then it overexpressed Ca^{2+} permeable cation channel and cell expanded by endosmosis which caused to death of cell.

KEY WORDS: photosynthetic bacteria, *Chroococcus* sp., adhesion, photocatalytic reaction, light penetration.

1. はじめに

現在、染色排水には染料だけではなく、窒素分も高濃度で含まれており、その窒素も同時に除去することが求められている。光依存性脱窒汚泥(photo dependent denitrifying sludge: 以下 PDDS と略す)は、高い脱色速度を持つ紅色非硫黄細菌と脱窒活性汚泥とが安定して共生する活性汚泥であり、可視光照射条件下でアゾ系酸性染料の分解と脱窒を同時に行うことができるものである^{1), 2), 3)}。また、実際の染色排水により近い組成の模擬染色排水を処理対象排水とし、連続処理リアクターを構築した研究では、脱窒処理の水素供与体としてメタノールを添加し、光照射条件下で PDDS により脱窒ならびに染料分解を行なっている。その結果、流入する窒素の 90% 以上を脱窒処理できること、アゾ系酸性染料による着色も 50~60% の効率で除去できることが明らかとなった⁴⁾。しかし、PDDS を光照射下で培養すると、光合成細菌の一部がリアクターの壁面すなわち光照射面に付着したり、廃水中の高濃度窒素と光供給によりリアクター内で藻類が異常増殖し、壁面へ付着する現象がおこる。それによって、固液分離効



左：光触媒なし 右：光触媒あり

図1 リアクター壁面への藻類の付着

* お茶の水女子大学人間環境科学専攻 (Department of Human Environmental Science, Ochanomizu University)

率の悪化、光透過量の低下などの問題が生じる。著者はこの問題を解決するため、光触媒を利用してこの藻類の増殖と付着を抑制し、光透過効率の改善を試みている⁵⁾。その結果、UV照射を用いた膜光触媒リアクターにおいては、壁面に藻類付着現象及び異常増殖現象は見られないことが分かった(図-1)。また、光触媒リアクターにおいては、PDDSの脱色能力を著しく増加させ、染色廃水の連続処理において必要な水理学的滞留時間を大幅に減らすことができた。また、可視光+紫外光照射下では光触媒によって、光合成細菌の増殖へは大きな影響を及ぼしていないことも明らかになった。本研究はこれまでの研究に基づき、PDDSによるAcid Blue92 (AB92)の除去効率に及ぼす光透過の影響について検討したものである。また、膜光触媒表面の物理特性及び酸化還元能力による光合成細菌及び藻類の付着防止効果について、単離培養種を用いて検討を行った。

2. 実験材料と方法

2.1 実験装置

光触媒反応によるPDDSリアクターの付着の影響を観察するため、図-2に示すような円筒型のガラスカップ(内径5cm, 外径8cm, 高さ5mm)をガラス板及びTiO₂コーティングありと無しの石英ガラス板で構成されたものを使用した(図-2b)。試料は所定の反応時間後に石英ガラスを外して直接ピペットで採水し、藻類のクロロフィルa濃度を測定した⁶⁾。また、石英板の光の透過率を調べるため、分光光度計(日立製作所 U-100)を実験に用いた。吸光セルなしの状態でゼロ調節を行い、光路上に対象サンプルとして板を設置し、200~800nmで透過率をスキャンした。実験中は装置の長時間使用のために生じる温度上昇の影響を抑えるために、反応容器とスターラーの間に断熱材発砲スチロールをおいた。連式のスターラーを利用して、実験装置を組み立てた。実験に使用した光源は、20W殺菌ランプ(東芝ライテック GL20)、20W蛍光ランプ(日立製作所 FL20SD-B)であった。

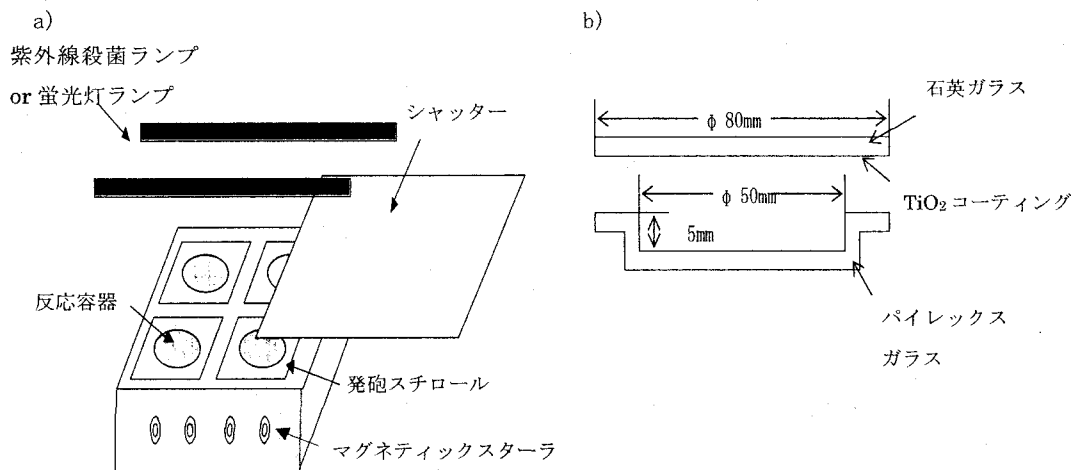


図2 反応装置図 a)装置の配置 b)円筒リアクター図

2.2 膜光触媒の焼成法

本研究では円盤状の石英ガラス板(直径8cm)に酸化チタンをディップコーティング法で固定化した。ディップコーティングとは、チタンのアルコキシド溶液に浸漬する基材を入れて、一定速度で引き上げ、乾燥させる方法である。酸化チタン溶液は日本曹達株式会社製保護接着層塗布液(NDC-100A)と光触媒層塗布液(NDC-100C)を用いた。引き上げ速度は30mm/minとし、直ちに120℃で15分間乾燥させた。形成

した酸化チタン層の膜厚はおおよそ $1\ \mu\text{m}$ であった。

2.3 光合成細菌と脱窒菌の分離

光合成細菌と脱窒菌の共生コンソーシアである PDDS から以下の操作で光合成細菌と脱窒菌を単離した。

PDDS を培養槽から適量を採取し、 $3,000\times g$ で 10 分間遠心分離して上澄を除去した。この PDDS を 0.8% の生理塩水に懸濁させた後、超音波発生器(300w, 1.5min 間)でフロックを分散し、0.8% の生理塩水を用いて 10 倍希釈列を作り、それぞれを滅菌した G-M 及び Giltay 固体培地⁵⁾(各培地に 1.5% の寒天を添加したもの)に 0.5ml ずつ植菌した。ここで G-M 培地は光合成細菌の培養を行うものであり、Giltay 培地は脱窒菌用として用いた。光合成細菌は、シャーレを密封することにより嫌気に近い状態にしたものを用い、蛍光灯により光照射を行った。30℃、3000 lux の条件下で約 1 週間の培養後、さらに滅菌した G-M 培地を 10ml ずつ試験管に分注した溶液に、シャーレより釣菌したコロニーを懸濁させ、平板培養と同様に嫌気明条件で集積培養を行った。脱窒菌は 30℃ の条件下で約四日間の培養後、さらに滅菌した Giltay 培地を 10ml ずつ試験管に分注したものに接種し植菌し、平板培養と同様に嫌気暗条件で集積培養を行った。このように集積培養された菌体を再び生理食塩水に懸濁させ、10 倍希釈列を作り、固体平板培地に植菌して培養した。

2.4 藻類の培養

顕微鏡で行った形態観察結果により、リアクター内に増殖した藻類は藍藻のクロオコックス属が主であった。そこで、純株 *Chroococcus* sp. (ATCC 27269) を実験に用い、藍藻培地(ATCC, 616 medium BG-11)を添加し、26℃、2000 lux の条件下で培養した。pH は 7.1 であった。

2.5 対象物質

PDDS 汚泥の分解対象染料として Acid Blue 92 (C. I. 13390, 東京化成工業、測定吸光波長：560nm、以下 AB92 と略す) を用いた。この構造式を図-3 に示す。この AB92 を脱窒培地⁵⁾に添加して供試試料とした。

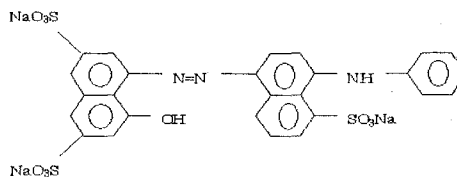


図-3 AB92 の構造

3. 結果と考察

3.1 PDDS による AB92 の分解効率に及ぼす光透過の影響

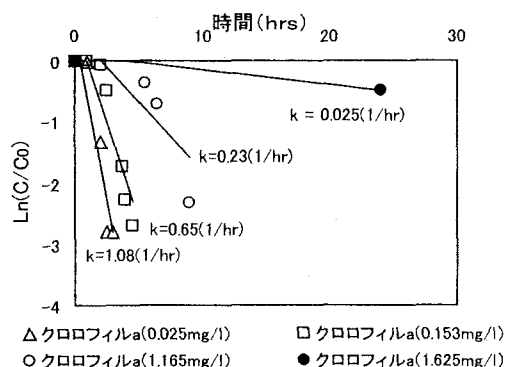


図4 PDDS による AB92 の除去速度に及ぼす藻類増殖の影響 (MLSS=2800mg/l, k:一次反応速度係数[1/hr], C:染料濃度, C₀:染料初期濃度)

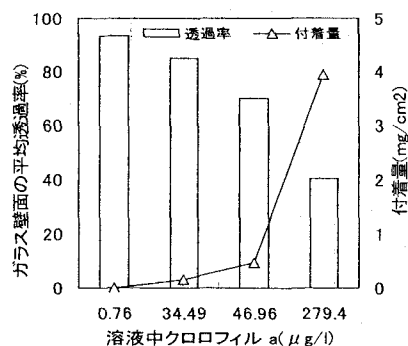


図5 藻類増殖によるリアクターのガラス壁面透過率の影響

藻類の PDDS への影響について、藻類の各共存濃度下における PDDS による AB92 の除去能力を図 4 に

示した。ここでは、脱色反応を一次反応と仮定して、AB92 の除去速度を比較した。クロロフィル a 値の増加につれて、AB92 の分解速度係数は大幅に減少した。クロロフィル a 値が 0.025 [mg/l] の時の AB92 の脱色速度は 1.625 [mg/l] の時の約 44 倍であった。この原因は、藻類濃度の増加による光透過の減少及び藻類の増殖による菌体活性の低下と考えられる。顕微鏡で行った観察結果により、増殖した藻類が PDDS の菌体と付着しており、大きな群落を形成することが認められた。既存の研究によれば、藻類細胞壁には、菌体を付着することができる⁷⁾。従って、PDDS に含まれる光合成細菌に、大量発生した藻類が付着し、群落を形成することにより、光合成細菌の比表面積が小さくなり、分解活性が低下したと考えられる。また、クロロフィル a 値が 0.025 [mg/l] とクロロフィル a 値が 1.625 [mg/l] の場合、分解速度定数は 44:1 となる。それぞれの溶液の吸収度は 2.1 (cm⁻¹)、2.5 (cm⁻¹) であったので、リアクター内の平均光量は光路長 10cm として、Lambert-Beer 法則より 1:0.84 と算定される。従って、藻類増殖による光量減少以上に、AB92 の分解速度が低くなっている。従って、藻類増加においては、藻類と光合成細菌の群落形成の効果の影響が非常に大きいと考えられる。

藻類増殖によるリアクター壁面における光透過率の影響について調べた結果を図 5 に示した。この図では回分試験開始後、1 日目、3 日目、6 日目、9 日目の PDDS 中の藻類濃度とその時のガラス壁面の透過率及び付着量の変化を示してある。図に示したようにリアクター内の藻類が増加するにつれて、リアクター壁面への付着量が増加し、平均光透過率が低下する傾向が見られた。既存の研究より¹⁾、藻類が大量発生しない PDDS による AB92 の比分解速度と入射光の強度との間に比例関係があることが分かっている。例えば、入射光強度が 50% に減少されれば、AB92 の比分解速度は約 51% 減少した。よって、PDDS による染料の分解能力を増加するためには、リアクター壁面への微生物付着防止も必要になる。

3.2 膜光触媒の表面物理特性によるリアクター壁面付着への影響

図 6 には PDDS から分離した光合成細菌、脱窒菌と純株 *Chroococcus* sp. を実験に用いて、膜光触媒の表面物理特性による付着因子への影響を調べた結果を示す。脱窒菌、光合成細菌及び *Chroococcus* sp. は暗条件下では光触媒の有無に関係なく、ほとんど付着がなかった。また、明条件下では光合成細菌と *Chroococcus* sp. は膜光触媒の有無に関わらず、一致した著しい付着現象が見られたが、脱窒菌ではほとんど付着はなかった。以上より、可視光照射下でのリアクター壁面への微生物付着は主に光合成細菌と藻類に由来することが分かった。また、細胞は親水性より疎水性表面に吸着しやすい性質があることが報告されている⁹⁾。光触媒は光照射により疎水性から親水性へ変わるが、この結果は PDDS 中の光合成細菌と藻類について、可視光照射下での付着防止効果は見られなかった。

3.3 光触媒酸化還元反応によるリアクター壁面付着への影響

図 7, 8, 9 は光触媒反応による PDDS, *Chroococcus* sp. 及び PDDS から分離した光合成細菌の付着抑制効果についての実験結果である。これらの図の縦軸は PDDS の働きに役に立つ可視光部分 (400nm~800nm) の透過率の平均値を示している。焼成した膜光触媒は 320nm 以下の波長を 95% 吸収し⁵⁾、透過しないため、透過 UV による藻類への殺藻効果の影響は小さいと考えられる。

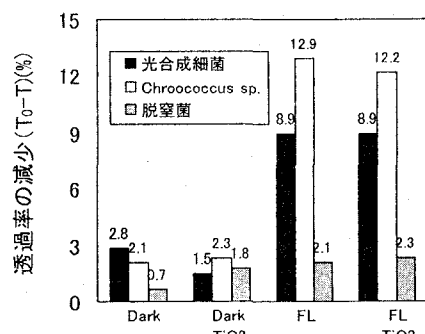


図 6 光触媒表面特性によるリアクターガラス壁面付着への影響 (光触媒反応なし、FL=3000lux)

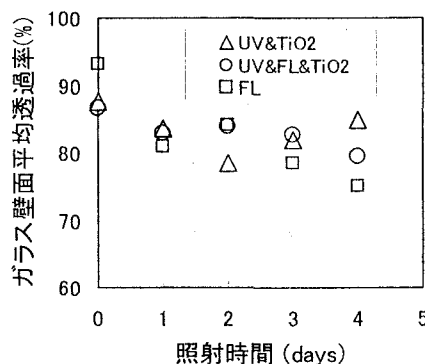


図 7 光触媒酸化還元反応によるリアクター壁面へ PDDS の付着影響 (FL=3000lux、UV=1.1~1.3 mw/cm²)

図より蛍光灯のみ照射した PDDS, *Chroococcus* sp. 及び光合成細菌のリアクターガラス壁面の平均透過率は大幅に減ったことが分かった。4 日後で透過率の減少幅は 18%, 12%及び 7%となった。一方、光触媒酸化還元反応を行った PDDS, *Chroococcus* sp. 及び光合成細菌のリアクターの透過率は照射前と比べ大きな違いはなかった。紫外線のみ照射下には、4 日後で透過率の減少幅は 2.8%, 0%及び 1.9%となった。紫外線+蛍光灯照射下には4 日後で透過率の減少幅は7.2%, 7.3%及び 2.1%となった。従って、光触媒反応は PDDS, *Chroococcus* sp. 及び光合成細菌の付着防止に効果があることが分かった。

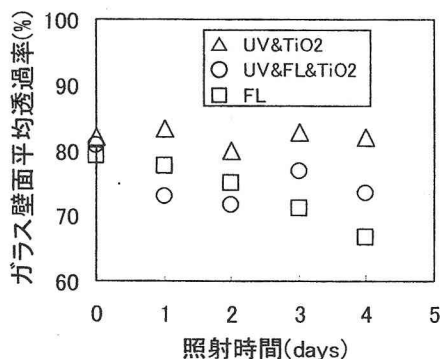


図 8 光触媒酸化還元反応によるリアクター壁面へ *Chroococcus* sp. の付着影響 (FL=3000lux、UV=1.1~1.3 mw/cm²)

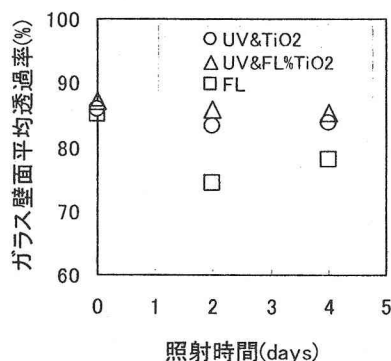
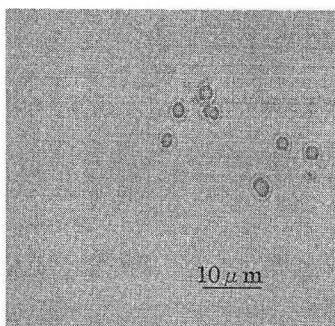


図 9 光触媒酸化還元反応によるリアクター壁面へ光合成細菌の付着影響(FL=3000lux、UV=1.1~1.3 mw/cm²)

3.4 光触媒反応による藻類への影響

a)



b)

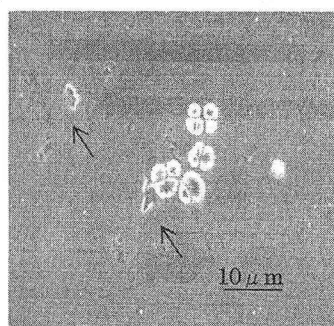


図 10 光触媒酸化還元反応による *Chroococcus* sp. の影響 a) 純株 *Chroococcus* sp. b) 光触媒反応を受けた *Chroococcus* sp. (UV=1.27mw/cm²、照射時間=2.5 時間)

光触媒反応は藻類の増殖能を破壊する能力を持つことが報告されている⁵⁾。そこで、純株 *Chroococcus* sp. を実験に用いて、光触媒反応による藻類の影響について顕微鏡で観察を行った(図 10)。透明膜に含まれた典型的な *Chroococcus* sp. を図 10a)に示した。2.5 時間光触媒反応を受けた試料中には、脱色され、細胞変形したのが見られた。また、*Chroococcus* sp. の内容物が飛び出し、細胞が飛散して、細胞を死に至らすことが分かった(図 10b))。

Hara ら¹⁰⁾の研究によれば、H₂O₂等の活性酸素種や一酸化窒素(NO)とLTPRC2(形質膜に存在するイオンチャネル)発現細胞の反応によって、細胞の形態が本実験の場合と似たような変化することが報告されている。

それによれば、 H_2O_2 等の活性酸素種や一酸化窒素 (NO) により、LTRPC2 チャンネルが活性化開口する。そのため、カルシウムイオンやナトリウムイオンが活性化された LTRPC2 チャンネルを通して大量流入し、細胞死に至っている。光触媒反応においても、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2$ などの活性酸素種が生成することが分かっており、*Chroococcus* sp. 細胞に対する同様のメカニズムが考えられるが、その点については今後の研究課題である。

4. 結論

- (1) PDDS によるリアクター壁面の付着は光合成細菌と藻類に由来することを判明した。
- (2) 高濃度の藻類共存下における PDDS の AB92 の除去能力においては、リアクター内の光透過より藻類と光合成細菌の群落形成に伴う効果の影響が非常に大きいと考えられる。
- (3) PDDS 中の光合成細菌と藻類の付着において、膜光触媒の表面特性は影響しなかった。
- (4) PDDS, *Chroococcus* sp. 及び光合成細菌の付着防止に効果があるのは、光触媒の酸化還元反応によることが分かった。
- (5) 顕微鏡観察により、光触媒反応後、*Chroococcus* sp. の内容物が飛び出し、細胞が飛散して、細胞を死に至らすことが分かった。

謝辞 本研究にあたって、熊本大学の古川憲治教授には、光依存性脱窒汚泥を提供して頂いた。ここに記して感謝いたします。

参考文献

- 1) 古川憲治、黒木征一郎、中岡元信：光依存性脱窒条件下での染料の微生物分解、*用水と廃水* Vol. 40, No. 9, pp. 775-78 (1998)
- 2) Furukawa, K., Kuroki, S., Nakaoka, M.: Biodegradation of azo dyes under photo-dependent anoxic conditions, *Proc. of Water Environment Federation 72th Annual Conference & Exposition (CD-ROM)* 1999.
- 3) Kuroki, S., Furukawa, K., Yoshiyama, M.: Biodegradation of acid azo dyes by newly isolated purple nonsulfur bacteria, *Japanese Journal of Water Treatment Biology* Vol. 37 No. 2, pp. 69-75, 2001.
- 4) Hong, J., Otaki, M., Joseph D. Rouse, Furukawa, K.: Continuous Treatment of Azo Acid Dyes by Photo-Dependent Denitrifying Sludge, *Journal of Environmental Sciences* p. 296-302 Vol. 14 No. 3, 2002
- 5) 洪静蘭, 大瀧雅寛：薄膜固定光触媒を利用した脱窒菌共存光合成細菌による脱色リアクターの高効率化, *土木学会論文集*, p. 111-118 No. 734, 2003
- 6) 日本水道協会、*上水実験方法*, 1993
- 7) Toncheva-Panova, T. and Ivanova, J.: Interactions between the unicellular red alga *Rhodella reticulata* and contaminated bacteria, *J Appl Microbiol* p. 497-504 vol. 93 No. 3, 2002
- 8) 稲田 勝美編著、*光と植物生育*, 養賢堂
- 9) Callow, M., Callow, J., Ista, Coleman, S., Nolasco, A., Lopez, G.: Use of self-assembled monolayers of different wettabilities to study surface selection and primary adhesion processes of green algal zoospores, *Appl Environ Microbiol* p. 3249-54 Vol. 66 No. 8, 2000
- 10) Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K., Mori, Y. LTRPC2 Ca^{2+} -Permeable Channel Activated by Changes in Redox Status confers Susceptibility to Cell Death. *Molecular Cell* 2002; 9:163-173.