

「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」
(中間)第1回分科会 資料5-1

「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」

事業原簿(公開)

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術開発部
-----	--

—目次—

概要

プロジェクト基本計画

プログラム基本計画

技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)

プロジェクト用語集

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性	1
1.1 NEDOが関与することの意義	1
1.2 実施の効果(費用対効果)	1
2. 事業の背景・目的・位置づけ	1

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標	3
2. 事業の計画内容	3
2.1 研究開発の内容	3
2.2 研究開発の実施体制	4
2.3 研究の運営管理	4
3. 情勢変化への対応	4
4. 中間評価結果への対応	4
5. 評価に関する事項	4

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果	7
2. 研究開発項目毎の成果	12

IV. 実用化の見通しについて

(実用化の見通しについて)

(添付資料)

・特許論文リスト

概要

最終更新日 平成21年8月31日

プログラム（又は施策）名	生物機能活用型循環産業システム創造プログラム						
プロジェクト名	微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発	プロジェクト番号	P07024				
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術開発部 / 長谷川 義基						
0. 事業の概要	<p>従来の産業における廃水・廃棄物処理技術は、①エネルギー多消費・廃棄物多排出、②低処理能力・対象廃棄物限定等といった課題を抱えている。これまで、このような課題に対し様々な工学的アプローチによる高度化はなされてきたものの、微生物群自体については、依然としてブラックボックスのままであり、自然の摂理の域を出ていないと考えられる。このため、特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術（これらの技術を「デザイン化技術」と呼ぶ）等を開発することにより微生物群の処理効率を大幅に向上させるなど、処理技術の課題を克服することが必要とされている。</p> <p>そこで本事業では、我が国の有する知見を活かしつつ、微生物群のデザイン化技術等を開発することにより、省エネルギーで余剰汚泥の大幅削減、コンパクトで容易なメンテナンス、あるいは多様な廃水・廃棄物への適用が可能な高効率型廃水、廃棄物処理（主として活性汚泥法・メタン発酵法を対象）の基盤技術を確立し、微生物機能を活用した環境調和型産業システムの創造に資する技術を開発する。</p>						
I. 事業の位置付け・必要性について	<p>本事業は「生物機能活用型循環産業システム創造プログラム」は、工業プロセスや環境関連分野へのバイオテクノロジーの利用を促進することにより、生物機能を活用した高度モノ作り社会の構築を図りつつ、廃棄物、汚染物質等の生分解・処理技術の高度化を通じ、環境に調和した循環型産業システムの創造を図るものである。本事業は上記プログラムの一環として、「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発／微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術」を開発する。</p>						
II. 研究開発マネジメントについて							
事業の目標	<p>①好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発 特定有用微生物（群）を、人為的に安定導入・維持するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価する技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスでのエネルギー使用量の約2/3の削減を図ること。さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。</p> <p>②嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発 特定有用微生物（群）を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価するための技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来のメタン発酵プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来のメタン発酵槽容積に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大を可能とすること。さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。</p>						
事業の計画内容	主な実施事項	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	H23fy	
	好気性微生物処理技術における特定有用微生物(群)を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発						→
	嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発						→
開発予算	会計・勘定	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	H23fy	総額
	一般会計						

(会計・勘定別に事業費の実績額を記載) (単位:百万円)	特別会計 (電多・高度化・石油の別)	188	192	114		494
	総予算額	188	192	114		494
開発体制	経産省担当原課	製造産業局生物化学産業課				
	プロジェクトリーダー	高知工業高等専門学校 藤田正憲 校長 (大阪大学名誉教授)				
	委託先 (* 委託先が管理法人の場合は参加企業数も記載)	(株)日立プラントテクノロジー、名古屋工業大院工学研究科、広島大院工学研究科、日本大生物資源科学部、北海道大院工学研究科、北海道大院地球環境科学研究所、早稲田大ナノ理工学研究機構、(財)電力中央研究所、名古屋大エコトピア科学研究所				
情勢変化への対応	研究の進捗に伴い、追加的資金配分、またプロジェクト内の連携体制を構築した。					
Ⅲ. 研究開発成果について	<p>① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物(群)を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発</p> <p>平成20年度までに、曝気エネルギー量低減のための内生呼吸を低減した微生物や外食厨房排水の油脂分解能力を示す微生物等の候補菌株の選抜を完了した。内生呼吸低減菌の評価法および装置や候補菌株の安全性の確認など特性評価も併せて進めた。</p> <p>また、集団を構成する微生物群へ特定有用微生物(群)を安定的に導入する技術として、包括固定高分子ゲルの利用や高性能の各種担体の候補を選定でき、これらの候補菌株、例えば油脂分解能力を示す微生物の安定的な優占化・維持の評価の検討を開始すると共に、石油分解菌では、安定的に優占化・維持される理由を明らかにし、その培養支持体の部分構造と機能を特定した。</p> <p>さらに“微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術の開発/好気性活性汚泥に使用される内生呼吸低減菌の開発”の加速化予算を執行し、内生呼吸低減菌の包括固定担体の研究を推進した。</p> <p>[実施体制:株式会社日立プラントテクノロジー(再委託:中央大学)、名古屋工業大学大学院工学研究科(共同実施:愛知県産業技術研究所)、日本大学生物資源科学部]</p>					
	<p>② 好気嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物(群)を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発</p> <p>平成20年度までに高効率ANAMMOXリアクター、部分消化リアクターの開発、メタン酸化細菌のDHSリアクター内への優占化、バイオフィルムによる、有用微生物の長期安定化を行った。また、様々なスケールにおける実験データの予測が可能となるシミュレーションモデルを開発した。</p> <p>[広島大学大学院工学研究科、北海道大学工学研究科、北海道大学大学院地球環境科学研究所、早稲田大学ナノ理工学研究機構]</p>					
	<p>③ 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発</p> <p>平成20年度までに、高効率処理を実現するために、優占的かつ安定的に維持すべき微生物群として、有機性廃棄物処理用のメタン菌(古細菌)や嫌気性の有機塩素化合物分解菌などの嫌気性分解微生物群の候補の集積を完了した。これら嫌気性菌の有機物の負荷の影響や獲得した微生物の組み合わせの効果、安全性など特性評価にも着手した。</p> <p>また“微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術の開発/アナモックス細菌のゲノム解析による増殖因子などの有用遺伝子の特定・検証試験”の加速化予算を執行し、新規な嫌気性アンモニア酸化菌(ANAMMOX)アナモックス細菌の増殖研究を推進した。また、有用微生物の特性に応じた各種担体利用の検討により、有機性廃棄物の分解速度の向上や有用微生物単独で分解困難な有機性廃棄物の分解等に寄与するような材質・形状の傾向を見出し、有用微生物群担体を電気制御することにより、特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術開発の目的を得た。</p> <p>[実施体制:電力中央研究所(共同実施:東京大学)、名古屋大学エコトピア科学研究所(再委託:基礎地盤コンサルタンツ)]</p>					
	投稿論文		論文発表 34件、口頭発表 102件、新聞・プレス・受賞等 12件			
特許		「出願済」6件				
Ⅳ. 実用化の見通しについて	本事業では、開発したデザイン化技術やデザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を組み合わせることにより処理の高効率化を図るのに加えて、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模での評価を行うなど実用化の一層の推進に取り組む。					
Ⅴ. 評価に関する事項	事前評価	18年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術開発部				
	中間評価以降	21年度 中間評価実施予定 24年度 事後評価実施予定				
Ⅵ. 基本計画に関する事項	作成時期	19年3月 作成				
	変更履歴	20年7月 変更				

(環境安心イノベーションプログラム・エネルギーイノベーションプログラム)
「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

「環境安心イノベーションプログラム」は、資源制約を克服し、環境と調和した持続的な経済・社会の実現と、安全・安心な国民生活を実現するため、革新的な技術の開発等を通じた地球全体での温室効果ガスの排出削減、廃棄物の発生抑制（リデュース）、製品や部品の再使用（リユース）、原材料としての再利用（リサイクル）推進による循環型社会の形成、バイオテクノロジーを活用した環境に優しい製造プロセスや循環型産業システムの創造、化学物質のリスクの総合的な評価及びリスクを適切に管理する社会システムの構築を推進するものである。本プロジェクトは上記プログラムの一環として、「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発/微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術」を開発する。

我が国が取り組むべき火急の課題である、環境負荷の低減と省エネルギー化の促進による循環型産業社会の構築には、物質生産プロセス（モノ作り）とその後処理の両面における技術開発が必要である。後処理においては、第3期科学技術基本計画（平成18年3月制定）における重点推進4分野の一つであるライフサイエンス分野において、「生物機能を活用した環境対応技術開発」が重要な研究開発課題として位置付けられる等、生物機能を活用した廃水、廃棄物の処理技術の高効率・高度化が求められている。

従来の産業における廃水・廃棄物処理技術は、①エネルギー多消費・廃棄物多排出、②低処理能力・対象廃棄物限定等といった課題を抱えている。例えば、①については、現行の廃水処理方法において、活性汚泥法が全体の約8割を占めており、その曝気に必要な電力量を石油換算エネルギーとして換算すると日本全体のエネルギー需要量の少なくとも約1.9%を占め、エネルギー消費量が多い。また、現在の廃水処理から発生する余剰汚泥や未利用有機性廃棄物の焼却・埋立処分に係るエネルギー・コストも相当なものになっている。現状のメタン発酵法においても、適用困難なものも含め年間発生する有機性廃棄物の総量約3億トンのうち、適用困難な対象の未利用食品廃棄物は年間約1,760万トンに上っている状況である。②については、産業が多様化する中、多種多様な産業廃水・廃棄物（高濃度廃水や難分解性物質を含む）に適用可能な処理技術の開発が必要とされている。

これまで、このような課題に対し様々な工学的アプローチによる高度化はなされてきたものの、微生物群自体については、依然としてブラックボックスのままであり、自然の摂理の域を出ていなかった。近年になり、我が国の関連研究開発プロジェクトをはじめ国内外において、廃水、廃棄物の処理における主要な微生物群の分離、同定、機能解明及び主要微生物群のモニタリング技術等の開発が進められ、知見が集積されつつある。

そこで、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO技術開発機構」という。）は特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術（これらの技術を以下、「デザイン化技術」と呼ぶ）等を開発することにより微生物群の処理効率を大幅に向上させるなど、処理技術の課題を克服することを目指して本プロジェクトを実施する。

本プロジェクトでは、我が国の有する知見を活かしつつ、微生物群のデザイン化技術等を開発することにより、省エネルギーで余剰汚泥を大幅に削減し、コンパクトでメンテナンスが容易であり、あるいは多様な廃水・廃棄物への適用が可能になる高効率型廃水、廃棄物処理（主として活性汚泥法・メタン発酵法を対象）の基盤技術を確立し、微生物機能を活用した環境調和型産業システムの創造に資する技術を開発することを目的とする。

(2) 研究開発の目標

最終目標（平成23年度末）

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

特定有用微生物（群）を、人為的に安定導入・維持するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価する技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスでのエネルギー使用量の約2/3の削減を図ること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

特定有用微生物（群）を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価するための技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来のメタン発酵プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来のメタン発酵槽容積に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大を可能とすること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

中間目標（平成21年度末）

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

特定有用微生物（群）を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群に人為的に安定導入・維持するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、以上の開発された技術とその機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の成果とを合わせて、約3倍の高効率化の見通しが確実に得られていること。

- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

特定有用微生物群を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群内において人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせ、従来のメタン発酵槽に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現する見通しが得られていることとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大の見通しが確実に得られていること。

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を委託により実施する。

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発
- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発実施体制

本研究開発は、NEDO技術開発機構が公募により選定し、研究を委託する、原則、本邦の企業、研究組合、公益法人、独立行政法人、大学等の研究機関（原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。）が、NEDO技術開発機構が指名した研究開発責任者（プロジェクトリーダー）の下で、それぞれの研究テーマの達成目標を実現すべく研究開発を実施する方式を採用する。

この場合において、各委託先は、企業、研究組合、公益法人、独立行政法人、大学等の単位であることを原則とする（以下、「企業単位等」という）。ただし、複数の企業単位等が結集して研究体を構成し、集中的な管理体制を構築する場合も、当該研究体を委託先として認めるものとする。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDO技術開発機構に設置する技術審議委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じてプロジェクトの進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成19年度から平成23年度までの5年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成21年度、事後評価を平成24年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発のうち、下記共通基盤技術に係る成果については、NEDO技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

- ・ 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持するための技術の開発並びに開発された技術とデザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の開発
- ・ 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発並びに開発された技術とデザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の開発

② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化等との連携を図るため、データベースへのデータの提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③ 知的財産権の所属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて受託者に帰属させることとする。

(2) 基本計画の変更

NEDO技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、内外の研究開発動向、産業技術政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) プロジェクトの根拠法

本プロジェクトは、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第一号ハに基づき実施する。

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成19年3月、制定。

(2) 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1) 研究開発の目的」の記載を改訂。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

1. 研究開発の必要性

処理効率が頭打ち状態にある従来の好氣的産業廃水処理技術の飛躍的な処理効率向上を実現するためには、産業廃水等の処理に最適な機能を持つ微生物群を人為的に制御することが必要である。そのためには、特定有用微生物（群）を人為的に安定導入・維持するための技術や、必要に応じて処理にとってマイナス要因となる微生物（群）を排除する技術等の基盤を開発することにより、高効率処理を可能とする微生物群をデザイン化するとともに、この微生物群の機能を処理プロセスで最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発することが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 特定有用微生物（群）の選抜と特性評価

集団を構成する微生物群に導入、維持するための特定有用微生物（群）を選抜、特定し、これらの特性評価を行う。

(2) 特定有用微生物（群）の安定的導入・維持技術の開発

集団を構成する微生物群へ特定有用微生物（群）を安定的に導入する技術、特定有用微生物（群）を安定的に優占化・維持するための技術、また、必要に応じて、処理にとってマイナス要因となる微生物（群）を排除する技術を開発する。

(3) 集団を構成する微生物群の処理機能の技術的有効性評価

デザイン化技術により得られた集団を構成する微生物（群）について、構成微生物のモニタリングや機能解析、処理効率を調べることにより、有効性を評価する。

(4) バイオエンジニアリング技術の開発

(2) で開発した技術により得られた微生物群の機能を最大限発揮させるための総合的なバイオエンジニアリング技術を開発する。

(5) デザイン化された微生物群の総合評価

特定有用微生物（群）を安定的に導入・維持するための技術の開発によってデザイン化された微生物群に（4）で開発したバイオエンジニアリング技術を適用し、処理効率等を評価する。

また、研究開発項目②で得られる微生物群を組み合わせた場合の処理効率等も調べることにより、実用化の可能性を総合的に評価する。

3. 達成目標

(1) 最終目標（平成23年度末）

特定有用微生物（群）を、人為的に安定導入・維持するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価する技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果と組み合わせることにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスでのエネルギー使用量の約2/3の削減を図ること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

(2) 中間目標（平成21年度末）

特定有用微生物（群）を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群に人為的に安定導入・維持するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、以上の開発された技術とその機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の成果とを合わせて、約3倍の高効率化の見通しが確実に得られていること。

研究開発項目②嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

1. 研究開発の必要性

処理効率が頭打ち状態にある従来の嫌氣的産業廃水・廃棄物処理技術の飛躍的な処理効率向上を実現するためには、廃水・廃棄物等の処理に最適な機能を持つ微生物群を人為的に制御することが必要である。そのためには、微生物と固体表面との相互作用及び微生物間の相互作用の解析・把握に基づき、特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術等の基盤を開発することにより、高効率処理を可能とする微生物群をデザイン化するとともに、この微生物群の機能を処理プロセスで最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発することが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 特定有用微生物群の特性・機能評価

高効率処理を実現するために、優占的かつ安定的に維持すべき微生物群を特定し、それらの機能や特性を評価する。

(2) 特定有用微生物群のデザイン化技術の開発

特定した有用微生物と固体表面との相互作用及び微生物間の相互作用を解析・把握することより、集団を構成する微生物群内において特定有用微生物群を空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術を開発する。

(3) 集団を構成する微生物群処理機能の技術的有効性評価

デザイン化技術により得られた集団を構成する微生物群について、構成微生物のモニタリングや機能解析、処理効率を調べることにより、有効性を評価する。

(4) バイオエンジニアリング技術の開発

(2) で開発した技術により、集団を構成する微生物群内において特定有用微生物群を空間的に配置し、その機能を最大限発揮させるための総合的なバイオエンジニアリング技術を開発する。

(5) デザイン化された微生物群の総合評価

特定有用微生物群を優先的かつ安定的に維持・空間配置する技術の開発によってデザイン化された微生物群に(4)で開発したバイオエンジニアリング技術を適用し、処理効率等(発酵槽容積のコンパクト化、滞留時間など)を評価する。

また、研究開発項目①で得られる微生物群を組み合わせた場合の処理効率等も調べることにより、実用化の可能性を総合的に評価する。

3. 達成目標

(1) 最終目標 (平成23年度末)

特定有用微生物(群)を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価するための技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来のメタン発酵プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来のメタン発酵槽容積に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大を可能とすること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

(2) 中間目標 (平成21年度末)

特定有用微生物群を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群内において人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の開発

での成果とを合わせ、従来のメタン発酵槽に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現する見通しが得られているとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大の見通しが確実に得られていること。

環境安心イノベーションプログラム基本計画

1. 目的

資源制約を克服し、環境と調和した持続的な経済・社会の実現と、安全・安心な国民生活を実現するため、革新的な技術の開発等を通じた地球全体での温室効果ガスの排出削減、廃棄物の発生抑制（リデュース）、製品や部品の再利用（リユース）、原材料としての再利用（リサイクル）推進による循環型社会の形成、バイオテクノロジーを活用した環境に優しい製造プロセスや循環型産業システムの創造、化学物質のリスクの総合的な評価及びリスクを適切に管理する社会システムの構築を推進する。

2. 政策的位置付け

第3期科学技術基本計画（2006年3月閣議決定）及び分野別推進戦略（2006年3月総合科学技術会議）における国家的・社会的課題に対応した研究開発の重点推進分野である環境分野及び国の存立にとって基盤的であり国として取り組むことが不可欠な研究開発の推進分野であるエネルギー分野に位置付けられるものであるほか、次のとおりである。

「地球温暖化対策技術研究開発の推進について」（2003年4月総合科学技術会議）

総合科学技術会議重点分野推進戦略専門委員会に設置された温暖化対策技術プロジェクトチームでまとめられた上記報告書における研究開発推進戦略に対応するものである。

Cool Earth - エネルギー革新技术計画（2008年3月経産省公表）

重点的に取り組むべきエネルギー革新技术「21」を含むものである。

京都議定書目標達成計画（2005年4月閣議決定）

目標達成のための対策と施策のうち地球温暖化対策技術開発の推進に位置づけられるものである。

イノベーション25（2007年6月閣議決定）

イノベーション立国に向けた政策ロードマップ - 技術革新戦略ロードマップ「世界的課題解決に貢献する社会 ものづくり技術分野」の中で「3R型設計・生産・メンテナンス技術、製品の設計・製造段階でのリサイクル阻害物質の使用排除を可能とする技術、製品中の有用・有害物質管理技術の開発・標準化」が資源を有効利用し、環境に配慮したものづくり技術として位置づけられている。

21世紀環境立国戦略（2007年6月閣議決定）

今後1、2年で重点的に着手すべき八つの戦略の中で「3R関連法制度等の充実や技術開発の支援を通じて、製品のライフサイクル全体での天然資源投入量の最小化や再生資源の高付加価値製品への利用を促進し、資源生産性の更なる向上と環境負荷の低減を図る」との方針が示されている。

経済成長戦略大綱（2006年7月財政・経済一体改革会議）

「環境と経済の両立を図るため、金融面からの環境配慮を進めるとともに、環境技

(2) 微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発(再掲)

() 微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発(運営費交付金)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、省エネルギーかつ環境負荷が少ないといった特徴を有する微生物機能を活用した有用物質の革新的な生産プロセス(モノ作り)の技術を構築するため、産業用途に必要な機能既知遺伝子で構成されたゲノムを持ち、物質生産性向上につながる性能を備えた高性能宿主細胞の創製や、微生物反応の多様化・高機能化技術を開発するとともに、バイオマスを原料として有用物質を体系的かつ効率的に生産する(バイオリファイナリー)ための基盤技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、物質生産性向上につながる性能を備えた高性能宿主細胞を創製するとともに、バイオプロセスの実用化適用範囲の拡大のための微生物反応の多様化・高機能化技術の開発を行う。バイオリファイナリー技術については、バイオマスを高効率で糖化し、糖から高効率で各種化成品の基幹物質を生産するバイオプロセス体系を構築する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(ii) 微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発(運営費交付金)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、従来エネルギー多消費・廃棄物多排出型であった廃水・廃棄物処理において、微生物群の構成及び配置等を人為的に制御(デザイン化)することで、その処理効率を大幅に向上させ、省エネルギーで廃棄物も少ない高効率型廃水、廃棄物処理の基盤技術を確立する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、特定有用微生物群を人為的に安定導入・維持もしくは人為的に空間配置・優先化させる等のデザイン化技術を開発し、従来の廃水、廃棄物処理に比べより高効率で省エネルギーな処理技術を開発するとともに、実用化に資するための実証可能なテストプラント規模にて評価する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(3) バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発(再掲)

概要

バイオマスに関する燃料分野と化成品分野の融合・連携を図り、食料と競合しないセルロース系原料から、より低コストで高効率なエネルギー化を可能にする先進的・革新的な新技術の確立を目指すとともに、バイオ燃料の製造のみならず、プロパノール、ブタノール製造、化学品の製造の実用化を目指した技術開発を行う。

技術目標及び達成時期

2012年度までに、セルロース系バイオマスを原料とし、バイオ燃料製造の従来技術に比べて画期的に優れた効率や低コスト化を可能とする糖化・発酵等の基盤

生物機能活用技術分野の導入シナリオ

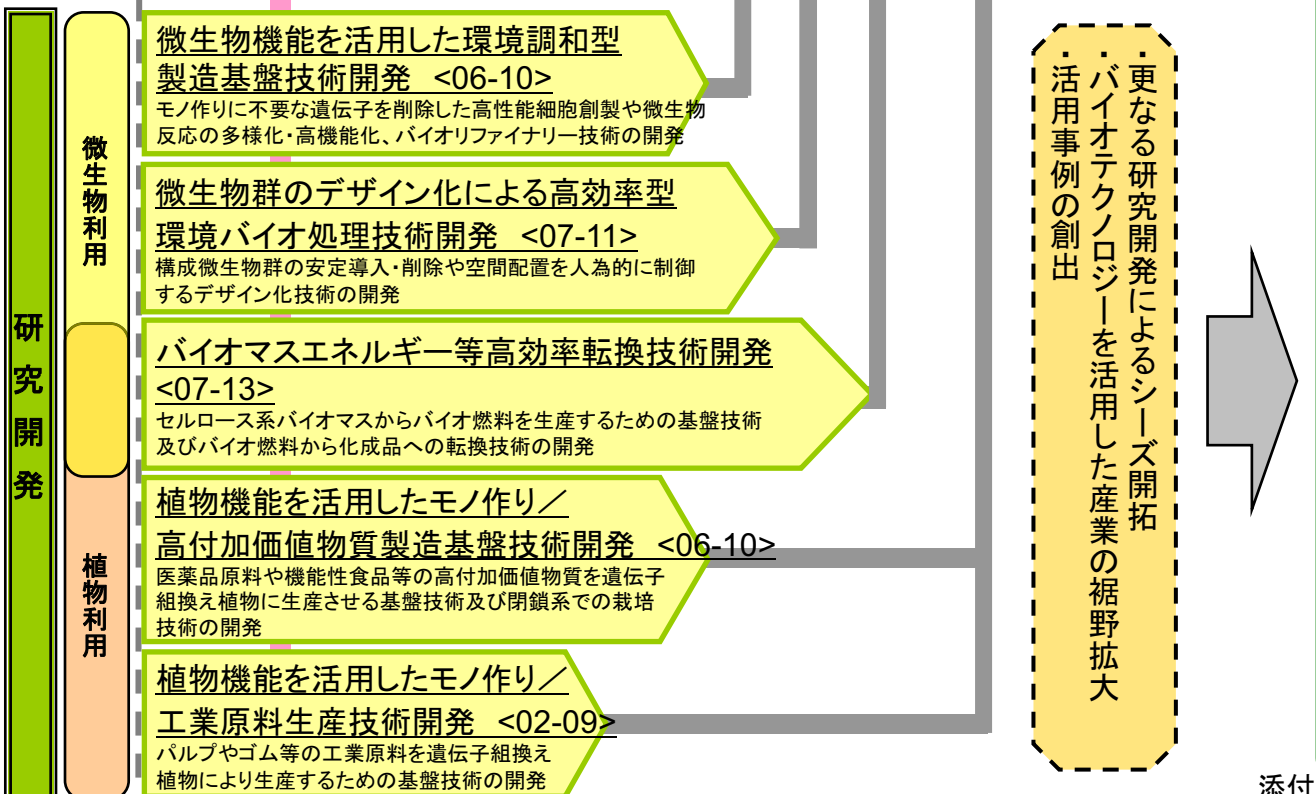
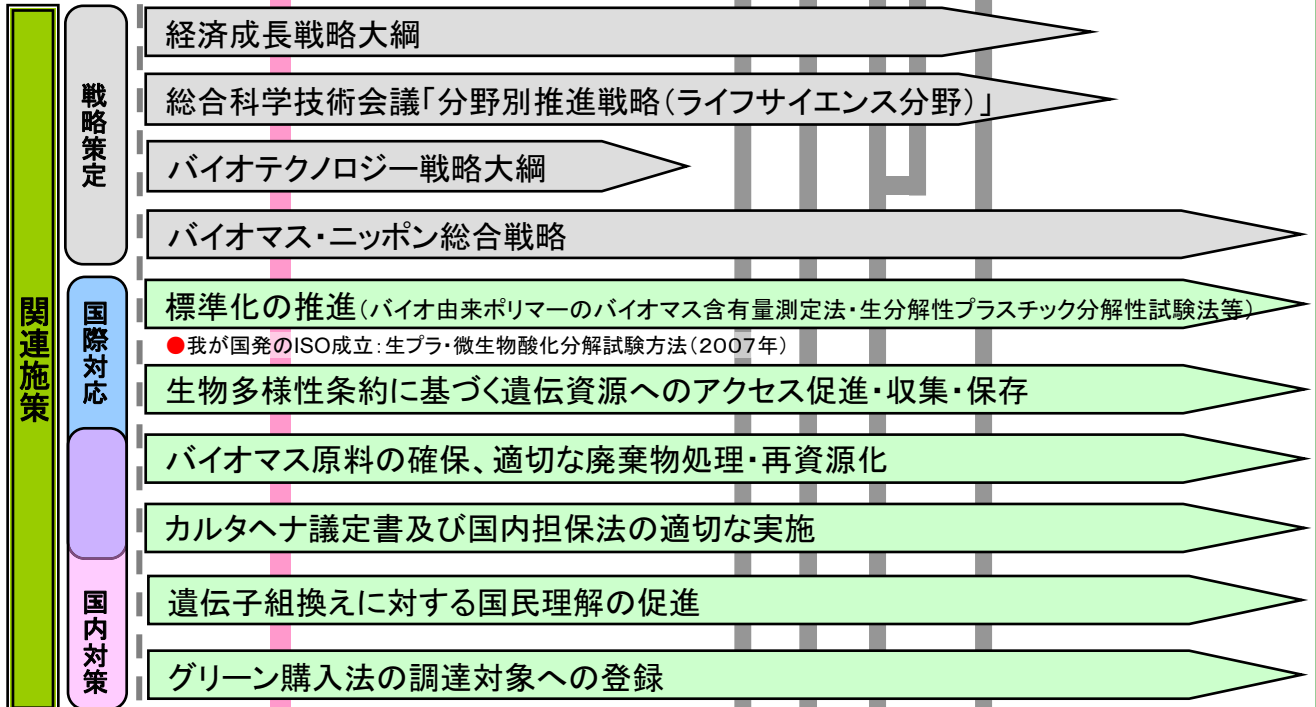
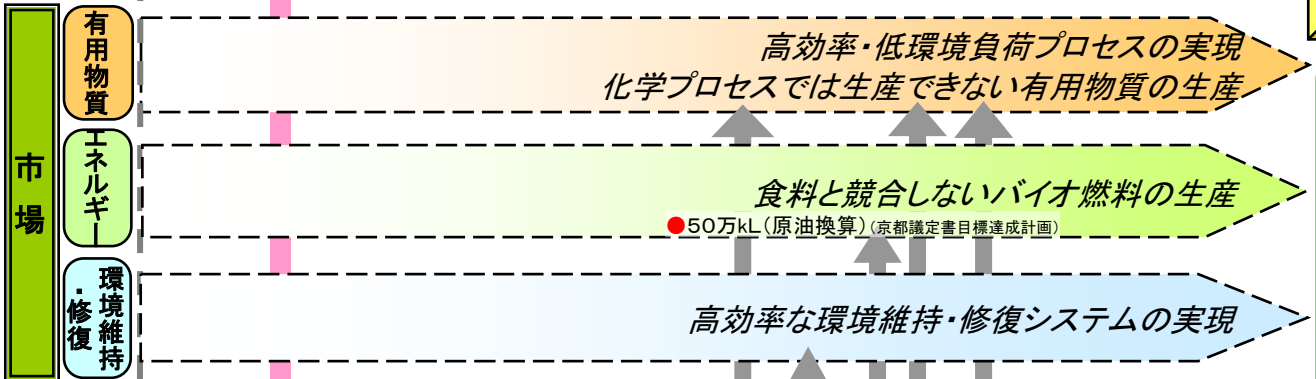
2009(現在)

2010

2015

2025

目的



生物機能を活用した環境調和型モノ作り・循環型産業システムの実現

生物機能活用技術分野の技術マップ(6/6)

3. 生物機能を活用した環境維持・修復技術

研究開発フェーズ

有用生物・遺伝子の探索・改良

プロセス技術

基本システムの構築

重要技術

日本の競争力
産業上の波及効果
ブレークスルー技術

強調

【共通技術】

- ◆新規微生物の探索・単離・同定
 - ・高機能微生物の探索・単離・同定技術
 - ・各種汚染物質除去微生物の探索・育種技術
 - ・有用遺伝子の特定・単離・解析技術
- ◆微生物の培養・利用技術
 - ・高機能微生物の培養・利用技術
 - ・各種汚染物質除去微生物の培養・利用技術
 - ・有用遺伝子の改変・利用技術
- ◆分解能解明に関する技術
 - ・微生物分解能解明技術
 - ・微生物細胞内取り込み機構の解明
- ◆DNA関連基礎技術
 - ・DNA抽出技術改良
 - ・DNA増幅技術改良
 - ・DNA検出技術改良
 - ・DNAチップ高感度化
- ◆安全性に関する技術
 - ・遺伝子水平伝播に関する汚染物質分解微生物の安全性の確認
- ◆複合微生物の活用
 - ・多機能微生物の解析・培養・応用技術

有害物質

- ◆難分解性物質の高分解能菌・酵素の探索・改良
 - ・メタゲノム解析
 - ・機能的脱塩素化を行う嫌気性細菌の培養転移系の確立
- ◆有害物質細胞内取り込み機構の解明と利用
 - ・有害物質の効率的な取り込み
 - ・有害物質細胞内取り込み機構の解明と利用
- ◆微生物による重金属の分離・回収技術の開発
 - ・バイオリアクター・バイオリアクター・バイオリアクター
 - ・微生物の持つ水銀還元作用による水銀の臭化技術
 - ・遺伝子進化による分解の効率化
- ◆植物による重金属吸収・回収の向上
 - ・重金属高濃度耐性植物の探索・育種技術
- ◆微生物による重金属の可溶化
 - ・重金属耐性・代謝・蓄積機構の解析技術

環境中放出後の処理

- ◆固定化バイオレメディエーション
 - ・固定化微生物の制御技術
 - ・固定化バイオレメディエーション
 - ・固定化バイオレメディエーション
 - ・微生物固定化促進剤の固定化技術
 - ・微生物分解と化学酸化の複合技術
- ◆オンサイトバイオレメディエーション
 - ・バイオリアクターの開発
 - ・バイオリアクターの開発
 - ・複合微生物培養技術(嫌気培養、好気培養)
- ◆ファイトレメディエーション
 - ・探査と機能解析・育種
 - ・遺伝子改変による機能強化

排出源での処理

- ◆脱臭・脱色・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色・脱色
- ◆高機能化プロセスの開発
 - ・高機能化プロセスの開発
 - ・高機能化プロセスの開発
 - ・高機能化プロセスの開発
 - ・高機能化プロセスの開発
- ◆脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
- ◆脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
- ◆脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色

環境維持・修復

- ◆土壌・底質
 - ・土壌・底質
 - ・土壌・底質
 - ・土壌・底質
- ◆水質
 - ・水質
 - ・水質
 - ・水質
- ◆大気
 - ・大気
 - ・大気
 - ・大気

循環型産業システムの創造・生物機能を活用した高度モノ作り社会の創造

環境維持・修復

- ◆土壌・底質
 - ・土壌・底質
 - ・土壌・底質
 - ・土壌・底質
- ◆水質
 - ・水質
 - ・水質
 - ・水質
- ◆大気
 - ・大気
 - ・大気
 - ・大気

排出源での処理

- ◆脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
- ◆高機能化プロセスの開発
 - ・高機能化プロセスの開発
 - ・高機能化プロセスの開発
 - ・高機能化プロセスの開発
- ◆脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
- ◆脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
- ◆脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色
 - ・脱臭・脱色・脱色

環境中放出後の処理

- ◆固定化バイオレメディエーション
 - ・固定化微生物の制御技術
 - ・固定化バイオレメディエーション
 - ・固定化バイオレメディエーション
 - ・微生物固定化促進剤の固定化技術
 - ・微生物分解と化学酸化の複合技術
- ◆オンサイトバイオレメディエーション
 - ・バイオリアクターの開発
 - ・バイオリアクターの開発
 - ・複合微生物培養技術(嫌気培養、好気培養)
- ◆ファイトレメディエーション
 - ・探査と機能解析・育種
 - ・遺伝子改変による機能強化

有害物質

- ◆難分解性物質の高分解能菌・酵素の探索・改良
 - ・メタゲノム解析
 - ・機能的脱塩素化を行う嫌気性細菌の培養転移系の確立
- ◆有害物質細胞内取り込み機構の解明と利用
 - ・有害物質の効率的な取り込み
 - ・有害物質細胞内取り込み機構の解明と利用
- ◆微生物による重金属の分離・回収技術の開発
 - ・バイオリアクター・バイオリアクター・バイオリアクター
 - ・微生物の持つ水銀還元作用による水銀の臭化技術
 - ・遺伝子進化による分解の効率化
- ◆植物による重金属吸収・回収の向上
 - ・重金属高濃度耐性植物の探索・育種技術
- ◆微生物による重金属の可溶化
 - ・重金属耐性・代謝・蓄積機構の解析技術

環境負荷物質

- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化

環境負荷物質

- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化

環境負荷物質

- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化

環境負荷物質

- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化

環境負荷物質

- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
- ◆有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化
 - ・有害微生物の定住化

研究開発課題

- ◆環境汚染物質の効率的な除去
- ◆有用生物・遺伝子の探索・改良
- ◆プロセス技術
- ◆基本システムの構築

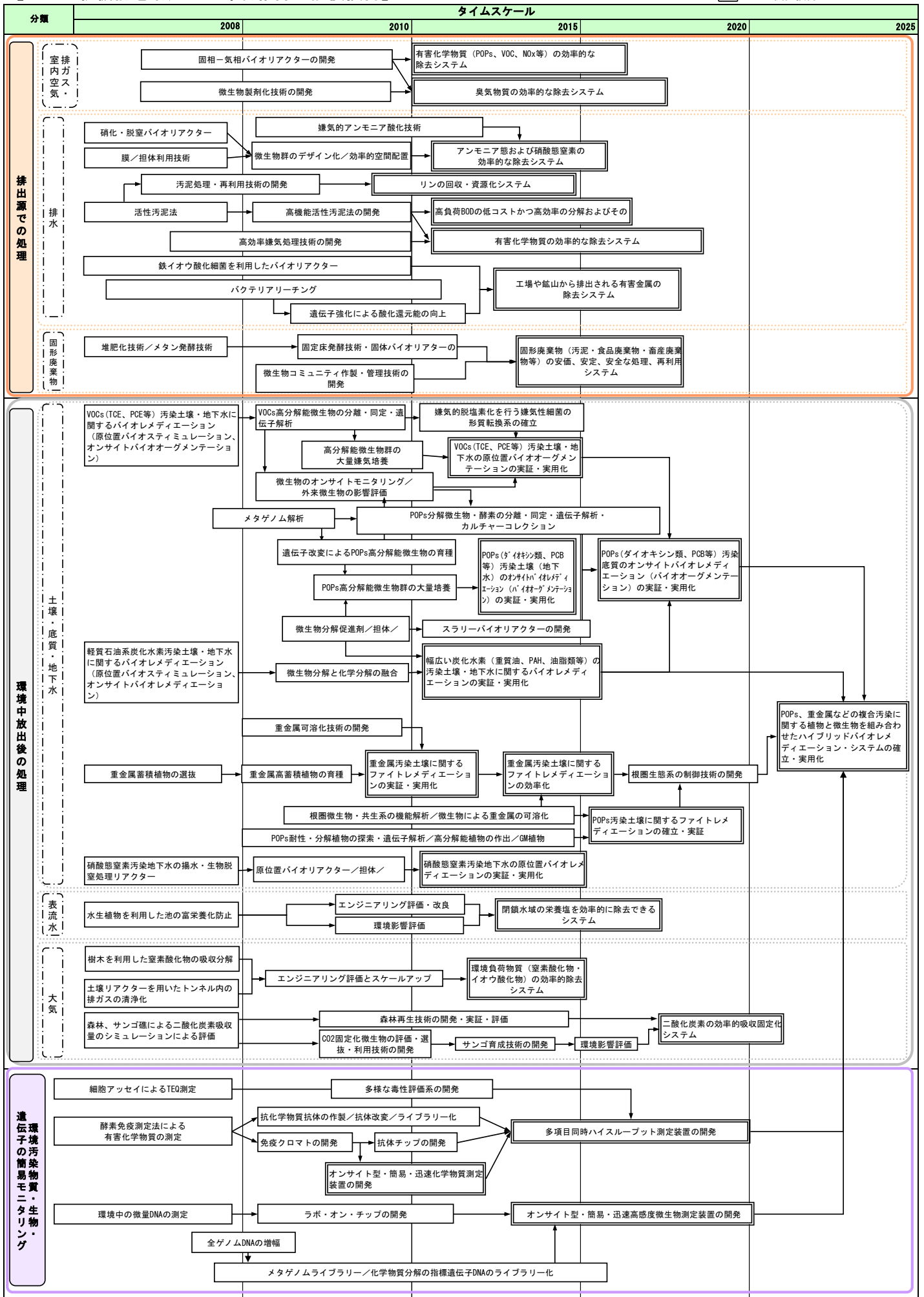
共通基盤

- ◆環境整備
- ◆基礎研究
- ◆人材育成
- ◆産学連携

生物機能活用技術分野の技術ロードマップ

- 技術の特性
- 対象とする物質
- 現状及び目的技術
- 開発技術

【3. 生物機能を活用した環境維持・修復技術】



プロジェクト用語集

用語	用語の解説
内生呼吸	細胞内の構成成分を自ら分解してエネルギーを獲得し、生命を維持するための呼吸。
内生呼吸低減菌	内生呼吸量が少ない菌。細胞内の構成成分(グリコーゲンなど)の蓄積が少ない菌や構成成分分解活性欠損菌などが、内生呼吸が少ない内生呼吸低減菌であると考えられる。
硝化	排水中のアンモニア性窒素が酸化され亜硝酸/硝酸性窒素を生成する反応。この反応を司る菌が硝化細菌(アンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌)である。
アンモニア酸化細菌	アンモニア性窒素を酸化し亜硝酸性窒素を生成する独立栄養細菌。亜硝酸菌とも云う。
亜硝酸酸化細菌	亜硝酸性窒素を酸化し硝酸性窒素を生成する独立栄養細菌。硝酸菌とも云う。
包括固定化微生物担体	有用菌をゲル内部に封じ込めた担体。ゲル内部で菌が増殖し高濃度の菌を保持できる。廃水処理槽で担体を流動させ、廃水と接触させ、廃水を処理する。
バイオフィルム	固体表面、特に水と接している表面に形成された、生物由来のゲル状の有機物に囲まれた細菌の共同体。
グリーストラップ	厨房における調理材料の残リカスや粗大ゴミおよび油脂分を排水と分離させ、配水パイプの詰まりを防ぐ装置。日本では法律によりすべての営業用調理施設に、油脂等分離するグリーストラップの設置が義務付けられている。
コロニー計数法	寒天培地上で細菌や酵母の細胞はコロニーつまり菌集落を作るが、一つの細胞が理論上一つの菌集落を作ると考え、その数を数えることで元の溶液中の菌密度を計数する方法。
遊離脂肪酸	油脂の分解によって生じる、生体内でエステルなどになっていない脂肪酸を指す。
薄層クロマトグラフィー	ガラス板上に固着された吸着剤の微粉末の薄い層を用いるクロマトグラフィー。吸着剤は、シリカゲル、アルミナ、セルロース粉末などが普通。試料を有機溶媒によって展開させ、抽出物質の確認、あるいは混合物の分離検出などに応用。
オレイン酸	遊離脂肪酸の一つ、一価不飽和脂肪酸、動物性脂肪や植物油に多く含まれている。オリーブオイル、キャノラ油やゴマ油に多く含まれる。
リパーゼ	脂肪を加水分解して脂肪酸とグリセリンとにする酵素。生物界に広く分布し、動物の膵液(すいえき)・胃液・腸液には消化酵素として含まれる。
グリセリン	別名グリセロール、3価のアルコール、無色で粘度・吸湿性が高く、甘味がある。医薬品や化粧品などに広く使われる。油脂分解産物の一つ。
凍結乾燥法	食品や微生物の細胞を凍結したままで氷(水分)だけを除去する方法。普通の乾燥法より細胞に与えるダメージが低いと言われる。
資化	微生物が栄養源にして、利用することを指す。
微生物製剤	化学物質を分解する力を有する微生物を利用した環境浄化剤を指す。これは微生物の化学分解能力で、汚染現場で浄化が行えるため、安全性が高く、環境汚染の対策に大きな力を発揮できる。
ノルマルヘキサン値	表記: N-Hex、ノルマルヘキサン抽出物質のこと。油脂等の汚れを計る一般的な値。ノルマルヘキサンに可溶性のある油分量を指す。
ポピュレーション解析	環境試料等を対象に、培養する必要がなく、存在している複数の微生物の種類を調べる方法。微生物の持つDNAを電気泳動を用いて、可視化したゲル上に分離させ、バンドの位置や本数の比較で、経時的な菌叢変化、試料間の比較、ある成分の関与している菌の特定等の解析が可能。
純粋培養	一種の生物や細胞のみを純粋分離して培養すること。
混合培養	2種類以上の生物や細胞を一つの培養系で培養すること。

N ₂ O	亜酸化窒素。窒素酸化物の一種。二酸化炭素の約210倍もの温暖化係数を持つ温室効果ガスであり、温室効果ガス排出削減の対象物質である。
嫌気メタン酸化	嫌気条件下におけるメタンの酸化分解。嫌気条件下でのメタンの分解には、嫌氣的メタン酸化古細菌と呼ばれる微生物が関わっていると考えられている。しかしながら、微生物の純粋培養株が得られておらず、メタン代謝機構等はよくわかっていない。
DHS	下向流懸垂型スポンジ (Downflow Hanging Sponge) の略。DHSはポリウレタンスポンジを固定担体とした生物膜型の排水処理装置である。DHSはエアレーションを必要としないことや余剰汚泥がほとんど発生しないといった経済面でのメリットに加え、メンテナンスフリーでコンパクト性を合わせ持ち、極めて良質な処理水を安定的に得ることが可能である。
HAP法	排水中のリンをヒドロキシアパタイト (HAP) の結晶として液中より回収する方法。晶析法の一つ。リンを含む排水に塩化カルシウム、水酸化ナトリウム及び脱リン剤を添加し過飽和状態にする事で、リンをHAPの結晶として回収する。
PAO	ポリリン酸蓄積細菌 (Polyphosphate-Accumulating Organisms) の略。
ポリリン酸蓄積細菌	菌体内にポリリン酸を蓄積する細菌。特に、嫌気条件下において酢酸などの有機物を摂取し、好気条件下においてリンを菌体内に取り込み蓄積するポリリン酸蓄積細菌は、下水処理における生物学的リン除去において重要な役割を果たしていると考えられている。
MAP法	排水中のリンをアンモニアとマグネシウムとの反応によって生成するリン酸マグネシウムアンモニウム (MAP) の結晶として液中より回収する方法。リンを含む排水に塩化マグネシウムや水酸化ナトリウム等を添加し過飽和状態にする事で、リンをMAPの結晶として回収する。
メタン酸化細菌	メタンをエネルギー源・炭素源として用いて生育する微生物。メタン酸化細菌と言った場合、一般的には酸素を用いてメタンを酸化する好気性細菌を指す。メタン酸化細菌とも呼ばれる。
固定床メタン発酵	槽内に担体を浸漬させることにより、担体表面上に微生物群を付着させ、その微生物群によって行う方式のメタン発酵法。
酸化・還元反応	反応系において、物質間で電子の授受を伴う反応。酸化と還元はあいまって起こり、反応系の1成分が電子を奪われて酸化されれば、他方に電子を得て還元される成分が存在する。
有機性廃棄物	炭素の酸化物や金属の炭酸塩などを除く炭素化合物からなる廃棄物。食品系廃棄物 (生ごみ) などが該当する。
模擬廃棄物	実験を実施するにあたり、人工的に作製した廃棄物。
デザイン化微生物群担体	有用菌が優占化し安定性を保持している微生物群集が担体表面上に付着している人工的に構築した担体のこと。
古細菌	生物群の一つであり、その分類の中にはメタンガスを生成するメタン菌が含まれる。
PCR-DGGE法	ポリメラーゼ連鎖反応 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の略。微生物群集構造解析法の一つで、培養せずに多数の微生物を一度に検出することができ、ゲル上で分離された各バンドが各微生物に対応する。
担体	反応槽内でメタン発酵を行うにあたり、微生物を表面上に付着させるための土台となる板や繊維のこと。
T-RFLP法	末端制限断片長多型解析の略。微生物群集構造解析法の一つで、培養せずに細菌種を比較することが可能である。本手法は、微生物群集の比較解析を行う上で、高感度と高処理能力を有している。
有機物負荷速度 (OLR)	反応槽内に投入する、単位時間、単位容積当たりの有機物の添加量。単位は、gCOD/L/日。
水理的滞留時間 (HRT)	反応槽内の内容物が完全に入れ替わるのに要する時間のこと。
低級脂肪酸 (VFA)	長鎖炭化水素の1価のカルボン酸のうち、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の炭素数が少ない揮発性の脂肪酸。
化学的酸素要求量 (COD)	被酸化性物質 (有機性物質) を酸化するために必要となる酸素量のこと、有機物濃度の指標となる。
浮遊固形分 (SS)	試料をろ過し、ろ過材上に残留した物質を105°Cで乾燥したときに残留した物質のこと。

クローン解析	解析対象のDNA断片群を解読し、得られた塩基配列を既にデータベースに登録されている配列と照合することで、試料中の微生物の種類と割合を推定する方法。
ゲノムDNA	菌体や環境試料から抽出した微生物(群)の全遺伝子。
T-RF(制限断片)	T-RFLP解析において制限酵素で切断された1つのDNA断片のこと。波形データ中では1つのピークを指す。
bp	塩基対:base pairの略で、塩基配列の長さを示す単位。
TAクローニング法	目的の遺伝子を増幅して単離する方法のこと。Taq DNA合成酵素を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、解析対象のDNA断片群の末端にアデニン(A)を1塩基付加する。これを末端にチミン(T)を1塩基付加した核酸分子に導入し、大腸菌を用いて核酸分子ごと目的の遺伝子を増幅して単離する。
ライブラリ	解析対象の遺伝子群の断片が1つ1つ個別の核酸分子内に導入されているものの集合物。
系統学的解析	解析対象の遺伝子を解読することで得られた塩基配列を他と比較し、その違いの割合から進化・系統の関係を推測して分類する解析法。
クローン	解析対象の遺伝子の単離を目的として得られた、同一の塩基配列を持つ均一なDNA断片群のこと。
酢酸資化性メタン菌	嫌気条件でメタンを生成する古細菌の中で、特に酢酸をメタンと二酸化炭素に変換することで生育するメタン菌のこと。
通電	電気をかけて反応槽内の2本の電極間(作用極と対極)で電流を通すこと。
作用極	反応槽内の電極のうち、目的とする電位に設定される電極のこと。
参照電極	反応槽内の作用極を目的とする電位に設定するにあたり、電位の基準点を与える電極のこと。従って、電位を制御する際には、作用極と参照電極間の電位を制御することになる。
電位	反応槽内における酸化還元反応系において、電子の放出しやすさ、電子の受け取りやすさを定量的に評価する尺度のこと。
対極	反応槽内の電極のうち、作用極の対となる電極のこと。電流を作用極に流すためには必ず必要となる。
アノード	酸化反応が生じる電極のこと。外部回路へ電子が流れ出す電極のこと。
カソード	還元反応が生じる電極のこと。外部回路から電子が流れ込む電極のこと。
クローンライブラリ	特定の遺伝子群の断片が1つ1つ個別の核酸分子内に導入されているものの集合物。
ランダムクローン	解析対象の遺伝子群を単離する際に形成された大腸菌の集団から非特異的に選抜すること、またはそうして得られたDNA断片のこと。
シーケンス	DNAを構成する塩基配列(ヌクレオチドの並び順)を決定すること。
BLAST	DNAの塩基配列またはタンパク質のアミノ酸配列をデータベースに既に登録されている配列と比較するための計算を自動的に行うプログラムのこと。
相同性検索	解析によって得られた遺伝子配列をデータベースに既に登録されている配列と比較し、その類似度を求めること。
配列	実験によって得られた、DNAを構成する塩基の並び順のこと。
水素資化性メタン菌	嫌気条件でメタンを生成する古細菌の中で、特に水素と二酸化炭素をメタンに変換することで生育するメタン菌のこと。
メタン発酵	嫌気性微生物の分業により高分子の有機物を徐々に低分子化し、最終的にメタン生成古細菌が酢酸、二酸化炭素、ギ酸からメタンを生成する反応。メタンはバイオガスとしてエネルギー回収できる。家畜糞尿などの有機性廃棄物をメタンへ変換が可能のため、バイオマス資源の有効利用の観点から近年注目されている。メタンの化学式からわかるように排水中の窒素源については全く除去できないのが欠点である。メタン回収後の消化液は高濃度のアンモニアを含むため、浄化処理が必要となる。

嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)およびアナモックスリアクター	嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)反応は嫌気性条件下でアンモニアを電子供与体、亜硝酸を電子受容体として窒素ガスへ変換する反応であり、省エネルギーかつ副産物の生成がない理想的な微生物反応($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 \uparrow + 2\text{H}_2\text{O}$)である。しかしながら、アナモックス反応を担う細菌は培養が非常に困難であるため、集積培養の報告例は極めて少なく、これまでに環境中から分離した事例はなく、窒素除去プロセスとして実用化例はない。本プロセスで使用するアナモックスリアクターは上向流の嫌気性固定床リアクターである。微生物担体には不織布および園芸用のネットを用いる。
部分硝化反応	硝化反応とは、廃水中のアンモニウムイオンを亜硝酸、さらには硝酸まで酸化する反応である。自然界では通常硝酸まで完全に酸化され、亜硝酸が蓄積することはない。しかしながら、アナモックス細菌は電子受容体として硝酸を用いることはできず、亜硝酸のみを利用可能なため、廃水中のアンモニアを亜硝酸に酸化し、亜硝酸から硝酸への酸化反応を抑制しなければならない。このように硝化反応を部分的に起こすことを部分硝化反応という。亜硝酸酸化反応の抑制方法としては、温度、pHのコントロールが知られている。
16S rRNA遺伝子系統解析	複合環境微生物サンプルからDNAを抽出し、その16S rRNA遺伝子の塩基配列を解読する。解読した16S rRNA遺伝子配列は、データベース上の既知の微生物の16S rRNA遺伝子配列と同一性を比較することにより環境微生物の系統分類学的位置を推定できる。微生物群集構造の解析には不可欠な手法となっている。環境微生物の環境中における機能についての直接的な情報は得られないが、近縁な分離株の機能情報を基に推定することができる。但し、これまで分離培養された微生物は現存種全体の約1%と見積もられていることから、近縁な分離株の機能情報と一致するとは限らない。
FISH法	Fluorescence in situ hybridization (FISH)法、生体内原位位置ハイブリダイゼーション法の略。検出したい微生物に特異的な遺伝子の配列部位に相補的に結合する合成遺伝子プローブ(オリゴヌクレオチド)を設計する。そのプローブに蛍光色素を付加した蛍光遺伝子プローブを、調査したい環境微生物群集に適用し、ある一定の温度、イオン強度条件下でプローブと、細胞膜を破砕せずに微生物細胞内の検出対象の標的遺伝子部位をハイブリダイゼーション(相補結合)させる。最終的に試料を蛍光顕微鏡観察することで、プローブの結合した細胞を同定・定量する技術。プローブの設計しだいで、種レベル、属レベル、またはそれ以上のレベルで目的とする微生物の検出が可能。培養を介さないため短時間で結果が得られ、培養困難な微生物も検出できるため、環境サンプルのような複合微生物系の群集構造を把握する手法として用いられている。
MAR-FISH法	微生物細胞を対象とした放射性同位体元素を用いたラベル化法であるマイクロオートラジオグラフィ(Microautoradiography)と蛍光in situ ハイブリダイゼーション(FISH)を組み合わせた方法。放射性同位元素で標識された特定基質の微生物細胞レベルでの取り込みを、写真感光剤の被膜の感光によって検出し、同時に微生物の同定を行うことができる。複合微生物系内で特定の物質を利用(分解)している微生物を解析する手法として極めて有用である。
バイオフィーム	固体表面あるいは界面に付着した微生物が形成する高次構造体。多糖類や核酸など生体高分子物質に覆われ、物理的・化学的・生物学的に高い耐性を有する。また微生物集合体でもあるので、微生物間相互作用が頻繁におこる。
根圏	根表面および根から0.1ミリメートル程度内の範囲。根圏では微生物-植物間相互作用が頻繁におこる。
浮遊細胞	バイオフィーム状態ではなく、溶液中に分散して浮遊しながら生育する単独細胞。
ANAMMOX	嫌気条件下で進行するアンモニア酸化反応(ANAerobic AMMonia OXidation)。その原因細菌をANAMMOX細菌(嫌気性アンモニア酸化細菌)と呼ぶが、いま純粋培養には成功していない。
フェノール、ナフタレン	いずれも有害な芳香族炭化水素化合物であり、環境汚染物質でもある。
Acinetobacter, Pseudomonas	いずれも環境汚染物質を効率良く分解できる細菌属。

ヘルパー細菌	活性汚泥中に含まれるアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌などの安定化および活性化に関与する未知の細菌。この細菌数を増やすことで間接的にアンモニア除去効率の向上が期待できる。
ヒンダー細菌	ヘルパー細菌とは対照的にアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌などを不安定化あるいは生育阻害する未知の細菌。この細菌数を減らすことで間接的にアンモニア除去効率の向上が期待できる。
バイオフィリアサドル、バイオステージ	微生物を付着させるために市販されている樹脂製担体。
SDS-PAGE	タンパク質変性剤を含む、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法。細胞に含まれるタンパク質を解析するための常法で、分子量の違いにより分離する方法。
システム論的アプローチ	全体を一つの相互に関連するシステムととらえて解析するアプローチ。微生物の生態を解析する場合、実験データだけでは複雑すぎて理解しきれないためコンピュータシミュレーションを組み合わせる。
微生物グラニューール	微生物自身の凝集作用によって形成された微生物造粒(凝集)体で、一般的に粒径0.2mm以上のものを指す。嫌気性細菌を主な構成微生物とする嫌気性グラニューールが有名であるが、近年は好気性グラニューールの形成も報告されるようになった。
半回分式リアクター(SBR)	排水等が間欠的に流入・流出するリアクター。生物学的排水処理に用いる場合は、一般に、流入・反応・汚泥沈降・流出工程を1サイクルとして、繰り返し運転を行う。
脱窒性リン蓄積細菌(DPAO または DNPAO)	無炭素、無酸素条件下で脱窒及びリンの取り込みを同時に行える微生物。この微生物は通常のリン蓄積細菌と同様に有機物存在下、嫌気条件で有機物を体内に蓄積し、リンを放出する。
Individual-based Model	個々の微生物細胞(または同種の微生物群)を一つのパーティクルとして表現し、周りの環境に応じて、成長、分裂、死滅、押出し、剥離などを実装したモデル。

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

1.1 NEDO が関与することの意義

本事業では、特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術等を開発することにより微生物群の処理効率を大幅に向上させるなど、処理技術の課題を克服することを目指す。これらの技術を開発し、さらに産業に有効な実用化技術としてゆくには一民間企業や一研究機関が単独で取り組み成果をあげることは資金的、研究ポテンシャル的にも無理がある。このため、民間企業のニーズと開発力を、大学等の基盤研究の蓄積に有機的に連携させ、NEDO の関与のもと、産学官共同事業として研究開発を推進するのが妥当である。

1.2 実施の効果（費用対効果）

本事業での特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術の開発により、処理効率が頭打ち状態にある従来の好氣的産業廃水処理技術や嫌氣的産業廃水・廃棄物処理技術の飛躍的な処理効率向上が期待でき、省エネルギーで余剰汚泥を大幅に削減し、コンパクトでメンテナンスが容易であり、あるいは多様な廃水・廃棄物への適用が可能になる高効率型廃水、廃棄物処理など微生物機能を活用した環境調和型産業システムの創造に資する技術の開発に貢献できる。

2. 事業の背景・目的・位置づけ

「生物機能活用型循環産業システム創造プログラム」は、工業プロセスや環境関連分野へのバイオテクノロジーの利用を促進することにより、生物機能を活用した高度モノ作り社会の構築を図りつつ、廃棄物、汚染物質等の生分解・処理技術の高度化を通じ、環境に調和した循環型産業システムの創造を図るものである。本プロジェクトは上記プログラムの一環として、「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発/微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術」を開発する。

我が国が取り組むべき火急の課題である、環境負荷の低減と省エネルギー化の促進による循環型産業社会の構築には、物質生産プロセス（モノ作り）とその後処理の両面における技術開発が必要である。後処理においては、第3期科学技術基本計画（平成18年3月制定）における重点推進4分野の一つであるライフサイエンス分野において、「生物機能を活用した環境対応技術開発」が重要な研究開発課題として位置付けられる等、生物機能を活用した廃水、廃棄物の処理技術の高効率・高度化が求められている。

従来の産業における廃水・廃棄物処理技術は、①エネルギー多消費・廃棄物多排出、②低処理能力・対象廃棄物限定等といった課題を抱えている。例えば、①については、現行の廃水処理方法において、活性汚泥法が全体の約8割を占めており、その曝気に必要な電力量を石油換算エネルギーとして換算すると日本全体のエネルギー需要量の少なくとも約1.9%を占め、エネルギー消費量が多い。また、現在の廃水処理から発生する余剰汚泥や未利用有機性廃棄物の焼却・埋立処分に係るエネルギー・コストも相当なものになっている。現状のメタン発酵法においても、適用困難なものも含め年間発生する有機性廃棄物の総量約3億トンのうち、適用困難な対象の未利用食品廃棄物は年間約1,760万トンに上っている状況である。②については、産業が多様化する中、多種多様な産業廃水・廃棄物（高濃度廃水や難分解性物質を含む）に適用可能な処理技術の開発が必要とされている。

これまで、このような課題に対し様々な工学的アプローチによる高度化はなされてきたものの、微生物群自体については、依然としてブラックボックスのままであり、自然の摂理の域を出ていなかった。近年になり、我が国の関連研究開発プロジェクトをはじめ国内外において、廃水、廃棄物

の処理における主要な微生物群の分離、同定、機能解明及び主要微生物群のモニタリング技術等の開発が進められ、知見が集積されつつある。

そこで、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO技術開発機構」という。）は特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術（これらの技術を以下、「デザイン化技術」と呼ぶ）等を開発することにより微生物群の処理効率を大幅に向上させるなど、処理技術の課題を克服することを目指して本プロジェクトを実施する。

本プロジェクトでは、我が国の有する知見を活かしつつ、微生物群のデザイン化技術等を開発することにより、省エネルギーで余剰汚泥を大幅に削減し、コンパクトでメンテナンスが容易であり、あるいは多様な廃水・廃棄物への適用が可能になる高効率型廃水、廃棄物処理（主として活性汚泥法・メタン発酵法を対象）の基盤技術を確立し、微生物機能を活用した環境調和型産業システムの創造に資する技術を開発することを目的とする。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

最終目標（平成23年度末）

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

特定有用微生物（群）を、人為的に安定導入・維持するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価する技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスでのエネルギー使用量の約2/3の削減を図ること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

特定有用微生物（群）を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価するための技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来のメタン発酵プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来のメタン発酵槽容積に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大を可能とすること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

中間目標（平成21年度末）

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

特定有用微生物（群）を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群に人為的に安定導入・維持するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、以上の開発された技術とその機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の成果とを合わせて、約3倍の高効率化の見通しが確実に得られていること。

- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

特定有用微生物群を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群内において人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせ、従来のメタン発酵槽に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現する見通しが得られていることとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大の見通しが確実に得られていること。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を委託により実施する。

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

下記研究開発テーマ：1）、2）、4）が該当する。

- ② 好気嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

下記研究開発テーマ：3)、及び7)、8)、9)が該当する。

- ③ 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

下記研究開発テーマ：5)、6)が該当する。

- 1) 内生呼吸低減菌等の有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発
- 2) 厨房廃水処理用油脂分解バイオフィルムの高機能化・安定化のための微生物製剤導入技術の研究開発
- 3) 高濃度微生物保持DHSリアクターによる溶存メタン・亜酸化窒素温室効果ガスの処理およびリン回収技術の開発
- 4) 有用石油分解菌*Cycloclasticus*のデザイン化に関する研究開発
- 5) デザイン化微生物群を用いた高効率固定床メタン発酵の研究開発
- 6) 嫌気性微生物群のデザイン化による芳香族塩素化合物の嫌気性完全分解技術の開発
- 7) 嫌気性アンモニア酸化(ANAMMOX)プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発
- 8) バイオフィルム工学による微生物のデザイン化の研究開発
- 9) システム論的アプローチによる微生物コミュニティデザインの研究開発

2.2 研究開発の実施体制

本事業は、委託先が9機関あり、この他に4の国公・私立また法人研究機関（中央大学、愛知県産業技術研究所、東京大学、基礎地盤コンサルタンツ(株)）との共同研究または再委託研究で実施されている（別添実施体制図ご参照）。

2.3 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、これまでに、3回研究開発委員会を開催し、進捗報告を受けて情報共有を行うようにした。

3. 情勢変化への対応

国内外の関連の学会などに積極的に参加、研究発表と情報収集を行うなどして、最新の研究動向の把握に務めると同時に、社会情勢・市場動向ならびに法規制等の外部要因の変化に応じて、逐次研究開発計画を見直してゆく。

4. 中間評価結果への対応

平成21年度に中間評価を行った。

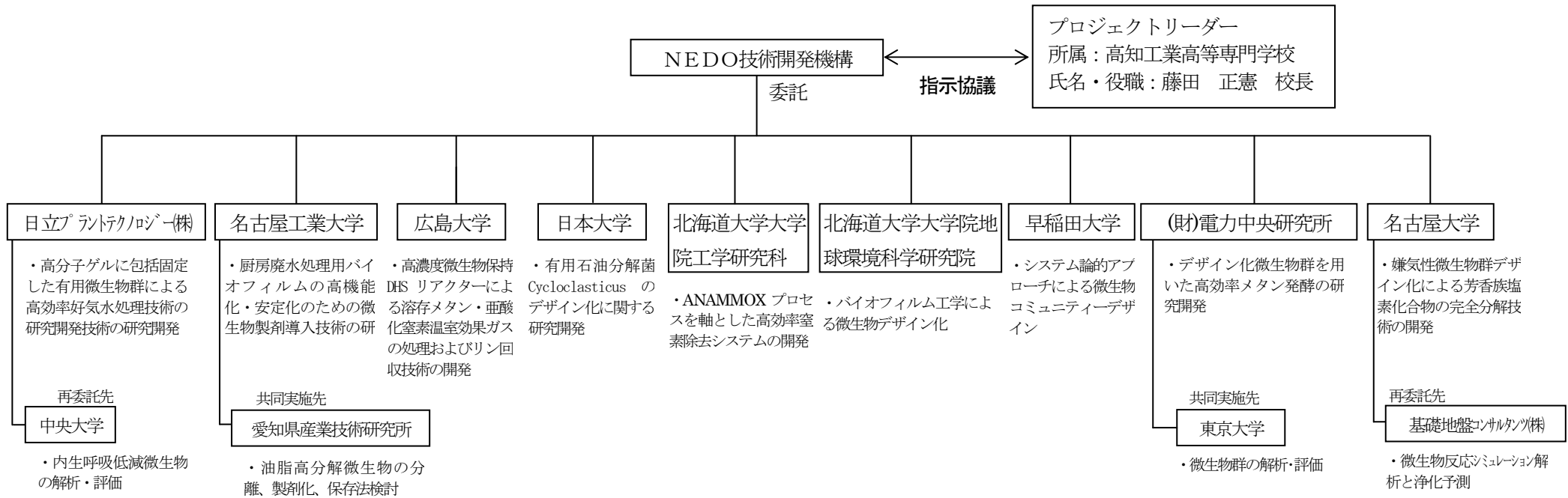
5. 評価に関する事項

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平

成21年度、事後評価を平成24年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

(別紙)

「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」実施体制



Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

本事業の研究開発は計画どおり順調に進捗し、中間目標とする事項に対してほぼ達成できた。

① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

平成20年度までに、曝気エネルギー量低減のための内生呼吸を低減した微生物や外食厨房排水の油脂分解能力を示す微生物等の候補菌株の選抜を完了した。内生呼吸低減菌の評価法および装置や候補菌株の安全性の確認など特性評価も併せて進めた。

また、集団を構成する微生物群へ特定有用微生物（群）を安定的に導入する技術として、包括固定高分子ゲルの利用や高性能の各種担体の候補を選定でき、これらの候補菌株、例えば油脂分解能力を示す微生物の安定的な優占化・維持の評価の検討を開始すると共に、石油分解菌では、安定的に優占化・維持される理由を明らかにし、その培養支持体の部分構造と機能を特定した。

さらに“微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術の開発/好気性活性汚泥に使用される内生呼吸低減菌の開発”の加速化予算を執行し、内生呼吸低減菌の包括固定化担体の研究を推進した。

[実施体制：株式会社日立プラントテクノロジー（再委託：中央大学）、名古屋工業大学大学院工学研究科（共同実施：愛知県産業技術研究所）、日本大学生物資源科学部]

② 好気嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

平成20年度までに高効率ANAMMOXリアクター、部分消化リアクターの開発、メタン酸化細菌のDHSリアクター内への優占化、バイオフィームによる、有用微生物の長期安定化を行った。また、様々なスケールにおける実験データの予測が可能となるシミュレーションモデルを開発した。

[広島大学大学院工学研究科、北海道大学工学研究科、北海道大学大学院地球環境科学研究院、早稲田大学ナノ理工学研究機構]

③ 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

平成20年度までに、高効率処理を実現するために、優占的かつ安定的に維持すべき微生物群として、有機性廃棄物処理用のメタン菌（古細菌）や嫌気性の有機塩素化合物分解菌などの嫌気性分解微生物群の候補の集積を完了した。これら嫌気性菌の有機物の負荷の影響や獲得した微生物の組み合わせの効果、安全性など特性評価にも着手した。

また“微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術の開発/アナモックス細菌のゲノム解析による増殖因子などの有用遺伝子の特定・検証試験”の加速化予算を執行し、新規な嫌気性アンモニア酸化菌(ANAMMOX)アナモックス細菌の増殖研究を推進した。また、有用微生物の特性に応じた各種担体利用の検討により、有機性廃棄物の分解速度の向上や有用微生物単独で分解困難な有機性廃棄物の分解等に寄与するような材質・形状の傾向を見出し、有用微生物群担体を電気制御することにより、特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術開発の目途を得た。

[実施体制：電力中央研究所（共同実施：東京大学）、名古屋大学エコトピア科学研究所（再委託：基礎地盤コンサルタンツ）]

研究開発項目毎の成果の概要は以下の通りである。

1. 1

好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

①内生呼吸低減菌等の有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発として、曝気による酸素供給のかなりの部分は環境汚染物質の分解に使われておらず、生命維持のための内性呼吸に使用されていることから、活性汚泥を構成する微生物のフローラに着目、フローラ菌種を人為的に限定し、内生呼吸低減菌などの菌群選定により内性呼吸量の低減を図り、曝気量に対する処理効率を向上させた。平成20年度までに、この限定された菌種のフローラの機能を安定化させるための包括固定化に使用する高分子ゲルを設計した。この高分子ゲルを用いてフローラを包括固定化し、機能を向上させた固定化微生物担体を得た。

[実施体制：株式会社日立プラントテクノロジー（再委託：中央大学）]

②厨房廃水処理用油脂分解バイオフィルムの高機能化・安定化のための微生物製剤導入技術の研究開発として、油脂分解微生物群からグリーストラップ内の環境（弱酸性、pH 6.0）でも活性を有し、かつ共生関係により高効率な油脂分解能力を示す新規の油脂分解有用微生物2株を分離した。現場グリーストラップに油脂分解有用微生物を投入し、実際に油分が分解されていることを確認した。また、16S rDNAのDGGE（denaturing gradient gel electrophoresis）解析により、導入した油脂分解有用微生物が現場グリーストラップに定着していることを確認した。さらに、分解活性を長期間維持するために、凍結乾燥を主体とする製剤化技術を検討した。

[実施体制：名古屋工業大学大学院工学研究科（共同実施：愛知県産業技術研究所）]

③本研究開発では、海洋性のPAHs分解菌*Cycloclasticus* がS-2 EPSの投与により複合微生物群集の中で、短期間で優占化し、PAHsの分解が3倍以上促進される理由を明らかにするため、i) 基質分解のための各種補助因子の獲得、およびii) 基質への吸着と安定した生育の場の確保という観点から分子レベルでの検討を行った。その結果、S-2 EPS中に含まれる脂質とカルボキシル基が、同菌が優占化に至るまでの期間の短縮および同菌によるPAHsの分解促進に重要であることを明らかにした。

[実施体制：日本大学生物資源科学部]

1. 2

好気嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

①高濃度微生物保持DHSリアクターによる溶存メタン・亜酸化窒素温室効果ガスの処理およびリン回収技術の開発として、排水処理に伴う温室効果ガス（メタンと亜酸化窒素）の放散防止とリン回収技術の基礎研究として、a. 溶存メタン酸化分解密閉型DHS(Down-flow Hanging Sponge)リアクターにおけるメタン酸化細菌の調査、b. 亜酸化窒素ガス生物分解の確認と微生物の同定および密閉型DHSリアクターによる分解実験の実施、c. チューブリアクターを用いてのポリリン酸蓄積細菌を優占化させる嫌気・好気時間等の影響を調べた。

[実施体制：広島大学大学院工学研究科]

②嫌気性アンモニア酸化 (ANAMMOX) プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発として、部分硝化—ANAMMOX直列型リアクターを構築した。このリアクターにおいて窒素除去速度 $6.2 \text{ kg-TN/m}^3/\text{d}$ を達成した。NH₂OHを添加することで、迅速かつ安定的な部分硝化反応を構築することに成功した。世界最高のANAMMOX速度 ($34 \text{ kg-TN/m}^3/\text{day}$) を達成した。部分硝化リアクターおよびANAMMOXリアクター内に存在する微生物群集構造を16S rRNA遺伝子解析およびFISH法により解析した。リアクター内のAnammox細菌のゲノム解析を完了した。

[実施体制：北海道大学工学研究科]

③バイオフィルム工学による微生物のデザイン化の研究開発として、アンモニア酸化細菌と正あるいは負の相互作用をもつ細菌を活性汚泥から探索した。ANAMMOX菌の表層タンパク質を解析した。炭化水素類など環境汚染物質分解浄化細菌のスクリーニングとそのバイオフィルム化および水生植物根への付着による浄化効率を評価した。

[実施体制：北海道大学大学院地球環境科学研究院]

④システム論的アプローチによる微生物コミュニティデザインの研究開発として、本テーマで開発するシステム論的アプローチを、モデルケースとしてアンモニア除去および窒素・リン同時除去型排水処理システム内の微生物グラニュールに適用するために、まず有用細菌群の増殖に関するパラメータを取得した。また、細菌間の相互作用、空間分布などを考慮したシミュレーションモデルを構築し、微生物コミュニティデザインの基盤技術として確立させた。

[実施体制：早稲田大学ナノ理工学研究機構]

1. 3

嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

①デザイン化微生物群を用いた高効率固定床メタン発酵の研究開発として、模擬廃棄物の分解に適した有用微生物群を取得した。取得した有用微生物群に関して、担体を導入して極相化した発酵槽内の微生物種（細菌、アーキア）をPCR-DGGE法やT-RFLP法を

用いて解析した。また、担体の物理化学的及び電気化学的性質や微生物群の固着性あるいは保持能力などについて評価することにより、分解能に優れた担体の選定を行った。さらに、発酵槽内に設置した担体に通電し、担体上の微生物叢の変化などに対する通電の効果を確認した。

[実施体制：電力中央研究所（共同実施：東京大学）]

②嫌気性微生物群のデザイン化による芳香族塩素化合物の嫌気性完全分解技術の開発として、多孔性無機資材を用いた微生物培養技術を元に、ダイオキシン類などの芳香族塩素化合物の還元的脱塩素化を行う微生物群と芳香族化合物の嫌氣的酸化を行う微生物群の両者を集積（一部単離）し、それらを共存させる嫌気反応系をデザイン化し、嫌氣的な条件のまま塩素化フェノール類等の芳香族塩素化合物の完全分解・無害化を達成した。更に、デザイン化微生物反応のモデル化を行い、浄化能力のシミュレーション評価を行った。

[実施体制：名古屋大学エコトピア科学研究所（再委託：基礎地盤コンサルタンツ）]

2. 研究開発項目毎の成果

2. 1 内生呼吸低減菌等の有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発

(委託先：株式会社日立プラントテクノロジー 再委託先：中央大学)

廃水処理技術で最も広範囲に利用され、普及しているのは活性汚泥法をはじめとする生物学的方法である。産業プロセスにおいて廃水処理は環境問題への関心の高まりとともに重要性がますます認識されてきたものの、廃水処理自体は何も産み出さない非生産プロセスであるため、より一層の効率化が求められている。活性汚泥法における最大のオペレーション・コストは曝気のための電気料金であり、いかに少ない曝気量でいかに大量の汚濁成分を除去するかが技術的な課題となってきた。曝気の効率をあげる装置的な工夫は永年行われてきたが、廃水中の汚濁成分を除去する機能を有する微生物の側からの検討はまったくと言ってよいほど行われていない。そこで、通常の活性汚泥での曝気された酸素の約 1/3 を消費する内生呼吸を低減させることについて検討を開始した。

本研究では、2. 1. 1 内生呼吸低減菌の探索、2. 1. 2 GC-QMS による内生呼吸低減効果の定量方法の開発、2. 1. 3 活性汚泥常在菌の内生呼吸、2. 1. 4 有用菌の安定維持方法について検討し、各項目について以下に記す成果が得られた。

2. 1. 1 内生呼吸低減菌の探索

1) 理論的考察

a) 内生呼吸と菌体量との関係

内生呼吸は、微生物が飢餓状態に陥ったときに顕著に観察され、細胞内に取り込んだ貯蔵物質を自己分解する際の酸素消費を指すとされている。すなわち、生体中の糖、タンパク質や RNA を好氣的に分解する代謝が内生呼吸であり、その結果、菌体量の減少をもたらす。しかし、内生呼吸に関する動力学的考察の文献を見出すことが出来ず、内生呼吸の増減と、菌体量および酸素消費量との関係を演繹的に推定することが困難であった。そこで、本プロジェクトでの研

究を開始するにあたり、先ず、活性汚泥処理を行なっている曝気層内での、内生呼吸を記述する式を導いた。

H: 水理学的滞留時間 (hr)

$d = 1/H$: 希釈率 (曝気槽流入量/曝気槽内容積: hr^{-1})

S_{in} : 流入する廃水中の BOD 濃度 (流入基質濃度: $\text{mmol O}_2/\text{liter}$)

$S_{\text{out}} = 0$: 流出する廃水中の BOD 濃度 (処理水基質濃度) はゼロと仮定する

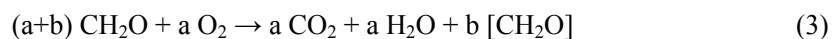
r_1 を呼吸定数 [specific oxygen uptake rate: $\text{mmol of oxygen consumed (S) per g dry weight of bacteria (X) per hr (t)}$] とする。また、 S は基質濃度、 K_s は飽和定数とすると:

$$(dS/dt) = r_1 \times X \times S/(S + K_s) \quad (1)$$

$$(dS/dt) = r_1 \times X \text{ when } K_s \ll S \quad (2)$$

通常、 K_s は S に比べて小さいので、以降、(2)式を用いる。

一般に、 a モルの酸素が消費されたとき、 a モルの CH_2O が $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ に変わり、その酸素消費に伴って、菌体量、 $[\text{CH}_2\text{O}]$ 、も b モル増加する。その関係は以下のように表される:



この時、mole の酸素消費あたりの菌体量の増加 (g dry weight)、すなわち、菌体収率 (growth yield coefficient) (Y_1 : g dry weight of bacteria/mol of oxygen) は、菌体組成を $[\text{CH}_2\text{O}]$ で近似すれば:

$$Y_1 = 32 \times b/a \quad (4)$$

曝気槽の菌濃度 (g dry weight of bacteria/liter)、 $X(t)$ は:

$$dX(t)/dt = S_{\text{in}} \times d \times Y_1 - X(t) \times r_2 \times Y_2 \quad (5)$$

但し、 $X(t) \times r_1 > S_{\text{in}} \times d$ for $t > 0$

更に、

r_2 : 内生呼吸定数

Y_2 : 自己分解収率 (“negative growth yield coefficient” or “weight loss coefficient” due to endogenous respiration: g dry weight of bacteria/mol of oxygen)

を定義すれば、内生呼吸による biomass の減少 (endogenous decay constant) は、 $r_2 \times Y_2$ で表すことができる。例えば、内生呼吸によって、貯蔵された炭化水素が消費される場合 $[C(H_2O) + O_2 = CO_2 + H_2O]$ 、1 mol の O_2 で、32 g の減量が起ころ、すなわち、 Y_2 は 32 g/mol O_2 となる。

(以上の式では、内生呼吸定数 (r_2) は、外生基質の有無に関わらず一定であるとした。これについては、後で検討する。)

以降、式の展開の見通しを良くするため、

$$S_{in} \times d \times Y_1 = k_f \quad (6)$$

$$r_2 \times Y_2 = k_b \quad (7)$$

と置き換えれば (5) 式は :

$$dX/dt = k_f - (k_b \times X) \quad (8)$$

すなわち、菌体量の増加は 0 次反応であり、減少が一次反応であるという形が見えてくる。一方、 $L = k_f/k_b$ と置き換えれば

$$L = (S_{in} \times d \times Y_1) / (r_2 \times Y_2) \quad (9)$$

(6) 式は :

$$dX/dt = [(k_f \times L) - (k_f \times X)] / L = (k_f/L)(L - X) \quad (8)$$

$$[1 / (L - X)] dX = (k_f/L) dt \quad (10)$$

(11) 式を積分すると :

$$\int_{X_0}^X \frac{1}{(L - X)} dX = \int_0^t (k_f / L) dt \quad (11)$$

但し、 $t = 0$ の時の菌濃度を X_0 とする。

$$[-\ln(L - X)]_{X_0}^X = [k_b t]_0^t \quad (12)$$

$$\ln[(L - X_0) / (L - X)] = k_b \times t \quad (13)$$

$$(L - X_0) / (L - X) = \exp(k_b \times t) \quad (14)$$

$$L - X = [(L - X_0) / \exp(k_b \times t)] \quad (15)$$

$$X(t) = L - [(L - X_0) / \exp(k_b \times t)] \quad (16)$$

$$X(t) = L \{1 - [1 / \exp(k_b \times t)]\} + [X_0 / \exp(k_b \times t)] \quad (17)$$

$$X(t) = (S_{in} \times d \times Y_1) \{1 - [1 / \exp(r_2 \times Y_2 \times t)]\} / (r_2 \times Y_2) + [X_0 / \exp(r_2 \times Y_2 \times t)] \quad (18)$$

BOD 除去に必要な最小の菌濃度、 X_{min} (g dry weight/liter) は :

$$S_{in} \times d - [r_1 \times (Y_1/32) \times X_{min}] = X_{min} \times r_1 \quad (19)$$

ここで、 $[r_1 \times (Y_1/32) \times X_{min}]$ は、BOD が菌体量へと変換された量である。

また、 Y_1 を 32 で除しているのは、 Y_1 を g dry weight で表現しているためである[式 (4) 参照]。

以下 :

$$y_1 = Y_1/32 \quad (20)$$

$$y_2 = Y_2/32 \quad (21)$$

と記す。

$$X_{min} = (S_{in} \times d) / [(1 + y_1) \times r_1] \quad (22)$$

$$X_{min} \times [(1 + y_1) \times r_1] = S_{in} \times d \quad (23)$$

であるから

$$X(t) = \{X_{min} \times r_1 \times [y_1 + (y_1)^2]\} \times \{1 - [1 / \exp(r_2 \times y_2 \times t)]\} / (r_2 \times y_2) + [X_0 / \exp(r_2 \times y_2 \times t)] \quad (24)$$

一方、時間当たりの内生呼吸量、 $X(t) \times r_2$ 、は :

$$X(t) \times r_2 = (S_{in} \times d \times y_1) \{1 - [1 / \exp(r_2 \times y_2 \times t)]\} / Y_2 + [(X_0 \times r_2) / \exp(r_2 \times y_2 \times t)] \quad (25)$$

$$X(t) \times r_2 = \{X_{min} \times r_1 \times [y_1 + (y_1)^2]\} \times \{1 - [1 / \exp(r_2 \times y_2 \times t)]\} / Y_2 +$$

$$[(X_0 \times r_2) / \exp(r_2 \times y_2 \times t)] \quad (26)$$

以上が内生呼吸 $X(t) \times r_2$ 、あるいは菌体量 $X(t)$ を記述する式である。この式を用いた曝気槽内での菌の増殖のシミュレーションについては後述する。

この式を参照しながら、内生呼吸を減少させるに必要なパラメーターの変化を以下に考察する。

▶曝気槽内の $X(t)$ を小さくすれば、当然、内生呼吸は小さくなる。しかし、 $X(t)$ を減らしすぎると、処理の不安定化を招くので、BOD 除去に必要な最小の菌濃度、 X_{\min} 、の数倍の $X(t)$ を曝気槽内に保ち運転されている。曝気槽内の $X(t)$ を小さくするためには、以下のパラメーター変化が有効である。

- ✓ 式 (21) より、 r_1 が大きければ、小さな $X(t)$ で処理できる。
- ✓ 式 (5) より、 Y_1 が小さければ、 $X(t)$ の増加が抑えられる。

▶一方、内生呼吸定数 r_2 を小さくすれば、内生呼吸は小さい。

b) 酸素の有効利用効率

曝気槽中で、酸素は、BOD の除去（分解と菌体への変化）と、内生呼吸とに使われる。前者は式 (23)、すなわち、 $X_{\min} \times [(1 + y_1) \times r_1]$ で与えられ、ここでの酸素は、BOD 除去に有効である。一方、内生呼吸、すなわち、 $X(t) \times r_2$ は、BOD 除去の観点で浪費である。そこで、酸素の有効利用効率（R）を、

$$R = X_{\min} \times [(1 + y_1) \times r_1] / [(X_{\min} \times r_1) + (X(t) \times r_2)] \quad (27)$$

と定義する。この値は、時間の関数であり、時々刻々変化するが、ある時点での $X(t)$ と X_{\min} の比、すなわち、廃水処理に最小限必要なバイオマスの何倍のバイオマスが存在するかを f で表せ

ば；

$$f = X(t) / X_{\min} \quad (28)$$

$$R = [(1 + y_1) \times r_1] / [r_1 + f \times r_2] \quad (29)$$

大腸菌においては、

$$y_1 = 0.3 \text{ (Noda et al., 2006)}$$

$$r_2 = 0.35 \text{ (本研究：後述)}$$

$$r_1 = 10 \text{ (本研究：後述)}$$

であるので、この値を式 (29) を代入すると、

$$R = 13 / (10 + 0.35f) \quad (29)$$

通常の運転では、BOD 酸化に使われる酸素消費量と、内生呼吸に使われる酸素消費量とはほぼ等しい。このことから、 f は 50 付近と推定できる。 $f = 50$ の場合の R は：

$$R = 0.47$$

もし、 r_2 を 40% 減少させることが出来れば (後述)、 R は：

$$R = 0.69$$

すなわち、酸素利用効率は約 50% 上昇することになる。

2) 大腸菌内生呼吸の生理学

以上の考察が妥当であるか否かを調べるため、大腸菌において、内生呼吸が低減した突然変異体を分離し、酸素利用効率が、内生呼吸低減によってどのように変化するかを調べることにした。

基質が無い時の呼吸、すなわち、内生呼吸は、1960年代に大腸菌を用いて研究されたが、それ以降、これと言った進歩は無い。大腸菌の場合でも、基質が無くなると、貯蔵物質の分解による内生呼吸が起こるが、その主な基質はグリコーゲンであるという (Dawes and Ribbons, 1965)。基質が無くなった時にタンパク質は分解されるが、合成も起こり、タンパク質の総量はほぼ一定である。また、脂質の分解はほとんど起こらない。結局、内生呼吸では、まずグリコーゲンが使われ、次に RNA 特にそのリボース部分が使われる。もしそうであるならば、グリコーゲンあるいは RNA の分解が欠損した突然変異体では、内生呼吸は低くなっている、すなわち、前式の r_2 が小さくなっていると思われる。

3) 大腸菌におけるグリコーゲンの合成と分解

図 1 にグリコーゲンの構造を示す。

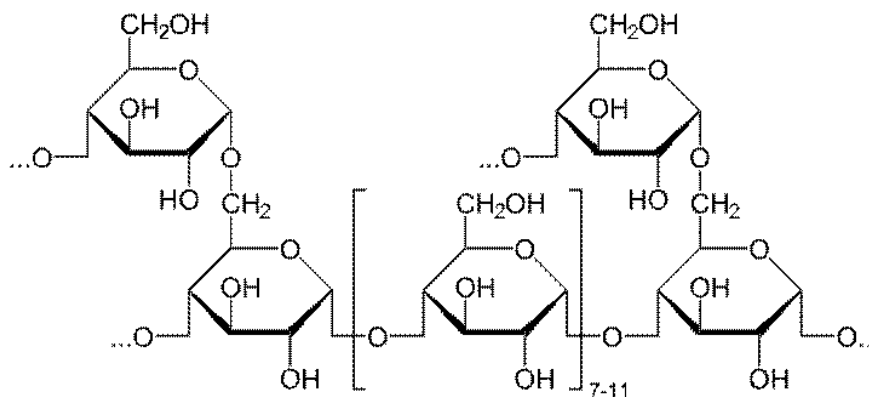
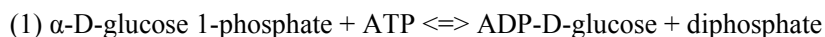
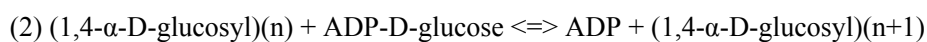


図 1 グリコーゲンの構造

グリコーゲンの合成経路は、以下の三つの酵素よりなる。



ADP-glucose pyrophosphorylase (GlgC; EC 2.7.7.27)



Glycogen synthase (GlgA; EC 2.4.1.21)

(3) 1,4- α -D-glucan \rightleftharpoons glycogen

Amylo-(1,4-1,6)-transglycosylase (GlgB; EC 2.4.1.18)

一方、グリコーゲンの分解に関与する酵素も知られている (図 2)。

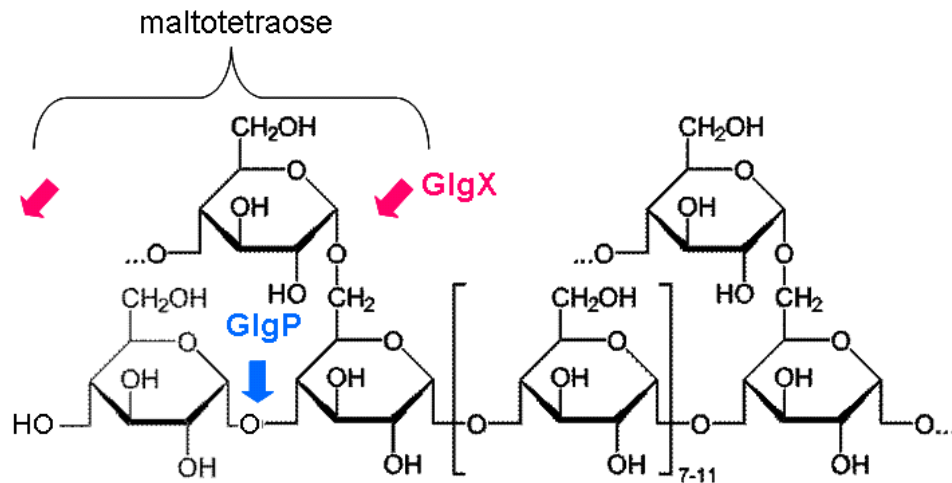
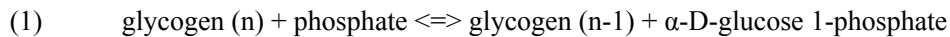
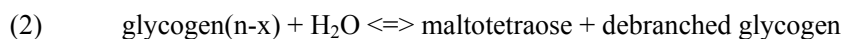


図 2 グリコーゲン分解に関与する酵素の作用箇所

分解の反応は以下の通りである (Dauvillée, D. *et al.*, 2005; Alonso-Casajús, *et al.* 2006)。



Glycogen phosphorylase (GlgP; EC 2.4.1.1)



Amylo- α -1,6-glucosidase (GlgX; EC 3.2.1.33)

すなわち、*glgX* および *glgP* 変異を持つ突然変異体は、グリコーゲンの分解に欠損がある故、内生呼吸が減少している可能性がある。これを実際に調べてみた。

4) 大腸菌の内生呼吸の測定

野生型の大腸菌 (Wt)、および幾つかの突然変異体の内生呼吸の測定を行った。用いた突然変異体は、(1) グリコーゲンの合成あるいは分解に欠損があるもの、(2) 複数ある RNA 分解酵素のいずれかに突然変異を持つもの、(3) あるいは ATP 合成に欠損があるものを用いた。用い

た突然変異体を表 1 に示してある。

Strain names	Alternative strain designation	Description (genotypes)
ME9062	BW25113	rmB3 Δ lacZ4787 hsdR514 Δ (araBAD)567 Δ (rhaBAD)568 rph-1
JW1279	BW25113 <i>mb</i>	defective in Rnase II
JW0603	BW25113 <i>ma</i>	defective in RNase I
JW2263	BW25113 <i>elaC</i>	defective in Rnase BN
JW3216	BW25113 <i>mg</i>	defective in Rnase G
JW5851	BW25113 <i>pnp</i>	defective in polynucleotide phosphorylase (PNPase)
JW3391	BW25113 <i>glgP</i>	defective in glycogen phosphorylase
JW3394	BW25113 <i>glgX</i>	defective in amylo- α -1,6-glucosidase
JW3393	BW25113 <i>glgC</i>	defective in ADP-glucose pyrophosphorylase
JW3475	BW25113 <i>yhiF</i>	defective in transcriptional regulator yhiF
JW3392	BW25113 <i>glgA</i>	defective in glycogen synthase
JW3395	BW25113 <i>glgB</i>	defective in amylo-(1,4-1,6)-transglycosylase
JW3712	BW25113 <i>atpA</i>	defective in F1-ATPase
CGSC7629	DH5alpha/pCP20	carry plasmid pCP20

表 1 使用した大腸菌株

まず、大腸菌それぞれの株を LB 培地中、30°Cで一晩（10 時間）培養し、LB 中での呼吸速度を、酸素電極を用いて測定した。また、乾重量は、きまった吸光度の細菌浮遊液を遠心し、集めた菌体を 110°Cで 1 時間乾燥させ、乾重量を測定した。野生型の LB 中の呼吸速度は、約 10: mmol oxygen per g dry weight per hr であり、この呼吸速度は、JW3712 株 (*atpA* 突然変異体) を除く突然変異体の、LB 中での呼吸速度とほぼ同じであった。

次に、これらの菌をリン酸バッファーにけん濁した時の内生呼吸を測定した。4°Cで 5,000 rpm、5 分間遠心し、沈殿した細胞を、100 mM リン酸バッファー (pH 7.4) にけん濁した。再度、4°Cで 5,000 rpm、5 分間遠心し、同じバッファーにけん濁した。この細菌浮遊液を、30°Cで、振とうしながら、一定時間保った。遠心終了後決まった時間後に、酸素電極を用い、30°Cで、細菌の呼吸速度を測定した。図 3 にその結果の一部を示す。

この図から明らかなように、リン酸バッファーにけん濁された直後 30 分は、呼吸速度が急速に減少する可能性があるが、それ以降は、呼吸速度は、徐々にしか減少しなくなる。遠心直後では、代謝され易い代謝中間体が菌体内に残っている可能性があるが、それが消費されたあとは、貯蔵物質が徐々に消費されるのであろう。野生型の内生呼吸速度は、LB 中の呼吸速度の 3-4%であった。予想通り、グリコーゲン分解が欠損した突然変異体の呼吸速度は、野生型より 3-4 割低かった。一方、RNase が欠損した突然変異体については、内生呼吸が野生型より低くはならなかった。

これらの実験のまとめを表 2 に示した。

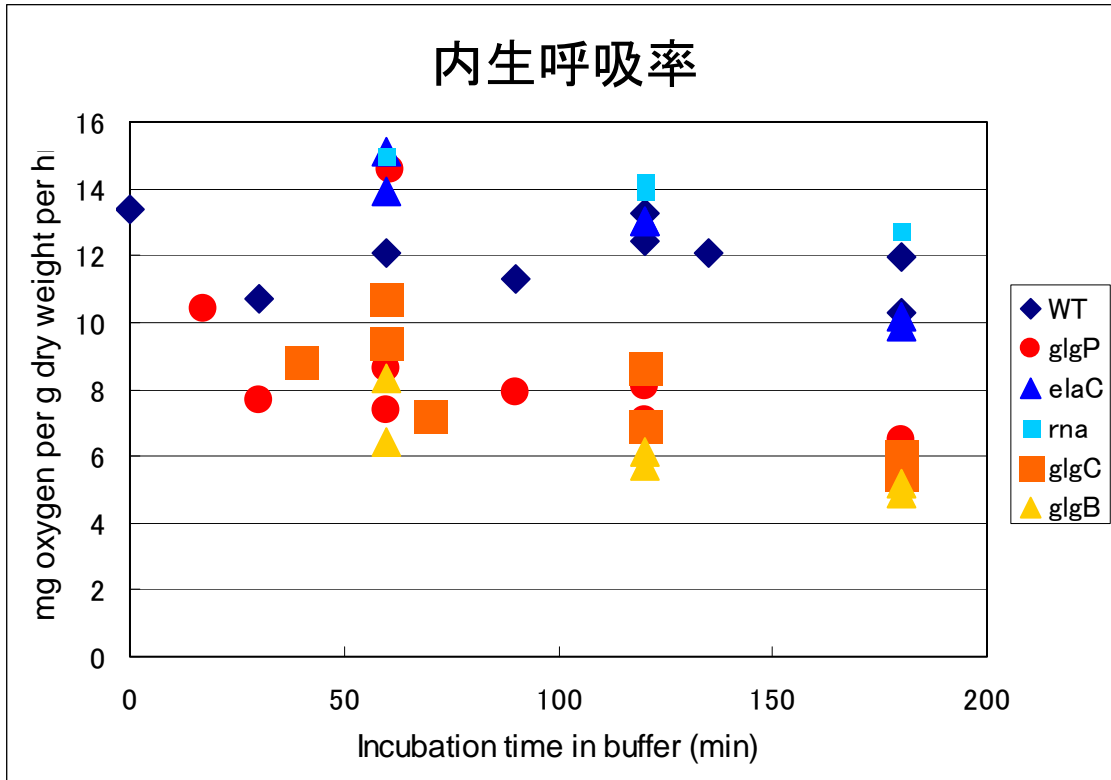


図3 大腸菌の内生呼吸 (WT : 野生型、突然変異体については、表1を参照)

Strain	Defect	Endogenous respiration (mg oxygen per g dry weight per hr)		% to WT
		Mean	Standard Deviation	
WT		11.9	1	100
<i>glgA</i>	Glycogen synthesis	7.3	0.8	61.3
<i>glgC</i>		8.6	1.6	72.1
<i>glgB</i>		6.3	1.2	53.2
<i>glgX</i>	Glycogen degradation	7.4	4	62.4
<i>glgP</i>		9.8	2.9	82.6
<i>elaC</i>	RNA degradation	13	1.9	108.9
<i>pnp</i>		11.8	3.1	99.3
<i>ma</i>		14.2	1	118.8

表2 大腸菌突然変異体の内生呼吸

グリコーゲンの合成および分解いずれかに欠損がある突然変異体は、いずれも野生型より低い内生呼吸活性を示し、突然変異の違いで有意の差があるとは認めがたかった。そこで、以降の実験では、*glgA* に変異を持つ突然変異体を用いることとし、その突然変異体に、RNA 分解の変異を加えることによって、内生呼吸が更に減少するかを調べた。

多重突然変異体の作成は、以下のようにして行った。今回使用した大腸菌突然変異体は、それぞれの遺伝子配列のほとんどを除去し、その代わりにカナマイシン抵抗性遺伝子（カナマイシン抵抗性カセット）を組み込んだものである（図 4）。このカナマイシン抵抗性カセットには、FRT (Flipase Recognition Target) という配列が、カナマイシンを挟む形で存在している。例えば、*glgA* の突然変異体には、*glgA* 配列に代わり、FRT-(Km^r)-FRT という配列が組み込まれている。左右の FRT 配列同士は、FLP リコンビナーゼ (Flipase recombination enzyme) が存在すると、部位特異的な組換えを起こす。すなわち、FLP リコンビナーゼを保持するプラスミド pCP20 をカナマイシン抵抗性カセットを持つ株に導入すると、FRT-(Km^r)-FRT の部分で組換えを起こし、1 コピーの FRT のみを保有する株が作成される。pCP20 プラスミドの増殖は温度感受性である。よって、カナマイシン抵抗性カセットを持つ株のコンピテンツセルを作成した後、pCP20 をコンピテンツセルに導入し、ヒートショックを加えることなしに、30°C で培養し、pCP20 のマーカーであるアンピシリン耐性で、形質転換体を選択した。この形質転換体を 30°C でコロニーを作らせ、さらに、そのコロニーから、シングル・コロニー・アイソレーションによって、複数のコロニーを作らせた。このようにして得られたコロニーは、もはやカナマイシンに対して抵抗性を示さなくなっていた。これは、pCP20 より発現した FLP リコンビナーゼによって、Km^r 遺伝子が切り出されたためである。このようにして得られたカナマイシン感受性 (Km^s) の細胞を、今度は 42°C で育てた。pCP20 は、温度感受性プラスミドであるので、この温度で増殖せず、細胞より脱落した。このようなプロセスを通して、Km^r の *glgA* 突然変異体を、Km^s の *glgA* 突然変異体に変えることが出来た（図 4）。

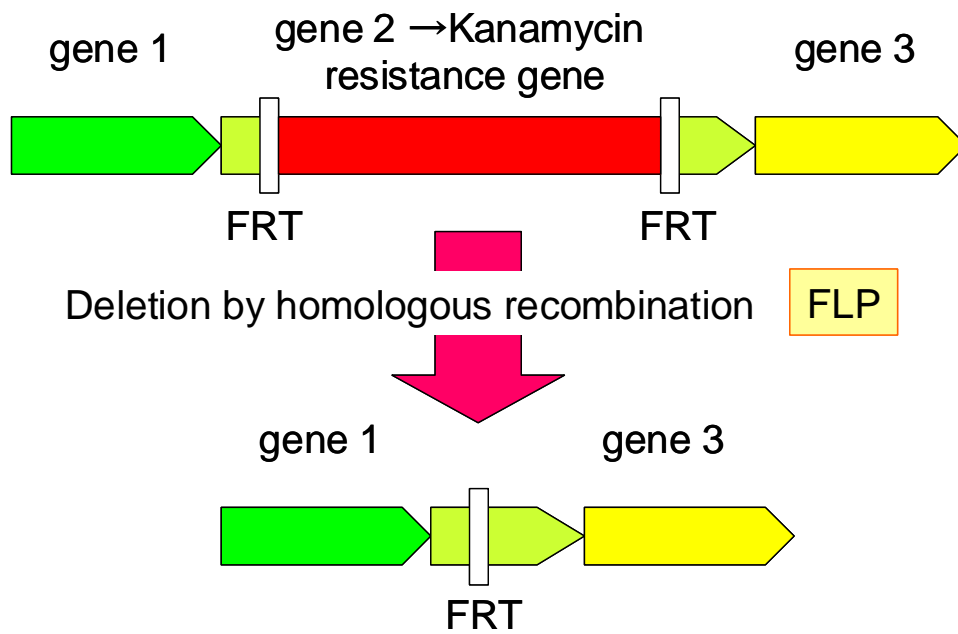
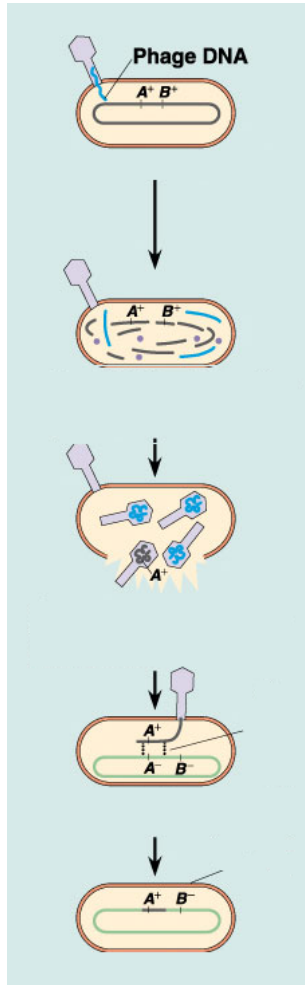


図 4 FLP リコンビナーゼを用いたカナマイシン耐性遺伝子の除去



次に、カナマイシンに感受性になった *glgA* 突然変異体に、RNase 欠損突然変異（例えば *rnb*: Km^r ）を、カナマイシン耐性をマーカーを指標にして導入し、*glgA* と RNase 突然変異（例えば *rnb*）の二重突然変異体を作成した。これは *rnb*: Km^r の導入として例示した以下の手順に従った。

まず、P1 ファージを、*rnb*: Km^r 突然変異を持つ突然変異体に感染させ、ファージライセートを調製した。次いで、カナマイシンに感受性になった *glgA* 突然変異体に、そのファージ・ライセートをもちいて P1 ファージを感染させ、カナマイシン耐性の形質導入を行った。得られたカナマイシン耐性株は、*rnb*: Km^r を獲得し、RNase I が欠損する。

図 5 P1 ファージを用いた形質導入 (transduction)

同様な方法で、*glgA* が欠損し、同時に RNase が欠損している株を作成した (図 6)。これらの株について、内生呼吸を測定した。内生呼吸量については、実験ごとの差が比較的大きかった。そこで、毎回の実験において、野生型と突然変異体とを培養し、野生型と突然変異体との内生呼吸の比を測定することにした。測定は、リン酸 buffer 中にけん濁させた大腸菌を、2 および 3 時間、30°C でインキュベーションした後測定した。野生株に対しては、50 回以上独立な測定を実施した。また、ほとんどの突然変異株に対しては 5-20 回の測定を実施した。(*glgA elaC rng* および *rna* 株については 2 回のみ。) 結果を図 6 に示してある。

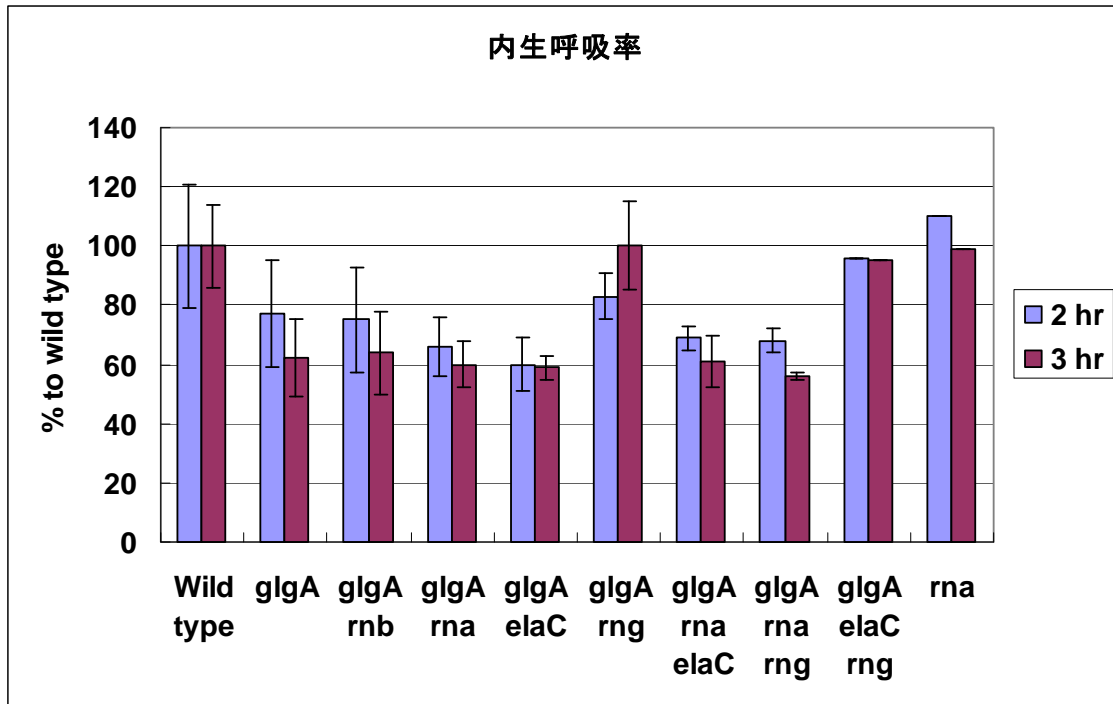


図6 *glgA* と RNase 欠損の多重突然変異の内生呼吸

これらの実験から、実験ごとの活性のばらつきが大きいにも関わらず、*glgA* および *glgA elaC* 等に二重・三重突然変異体では、内生呼吸が野生型に比べて優位に低く、平均して 40%あるいはそれ以上の減少率であることがわかった。このようにして、目的としていた内生呼吸低減株を得ることが出来た。現在、これらの株を用い、酸素消費効率を測定中である。

5) ATPase 欠損突然変異の増殖特性

式(5)の右辺は、二つの項に分かれる。

$$dX(t)/dt = (S_{in} \times d \times Y_1) - (X(t) \times r_2 \times Y_2) \quad (5)$$

すなわち、 $(S_{in} \times d \times Y_1)$ は、BOD 消費によって、増殖する部分を示し、 $(X(t) \times r_2 \times Y_2)$ は内生呼吸によって、減少する部分を示す。 $X(t)$ が増加すれば、内生呼吸も増加するので、内生呼吸減少という観点からは、 $X(t)$ の増加が少ない方が良い。そして、増加に関わる項は、 Y_1 に比例する。すなわち、菌体収率が低ければ、 $X(t)$ の増加が抑えられる。

一方、曝気槽内の菌体量は、BOD 除去に必要な最小の菌濃度、 X_{min} の数十倍に保たれ、安定

的な運転を保証している。もし、 X_{\min} の値が小さければ、安定的に運転するのに必要な菌体量も小さくなり、その結果、内生呼吸量も小さくなる。式(22)から、呼吸定数 r_1 、あるいは菌体収率 (Y_1 あるいは y_1) が大きければ、 X_{\min} が小さくなることが判る。

$$X_{\min} = (S_{\text{in}} \times d) / [(1 + y_1) \times r_1] \quad (22)$$

Y_1 が小さく、かつ r_1 が大きい大腸菌の突然変異体が知られている。それは ATPase が欠損した突然変異体 (*atpA*) である (Noda et al., 2006)。実際に、*atpA* 突然変異体を用い、LB 中での呼吸と、増殖後の最終到達菌濃度を測ってみると、 Y_1 が小さく、かつ r_1 が大きいことが示唆された (表 3)。

	WT	<i>atpA</i>	Ratio
Respiration rate (r_1 : mmol oxygen per g dry weight per hr)	10.9	18.3	1.68
Maximum growth yield in LB (Y_1 : g dry weight/l)	0.837	0.439	0.52

表 3 *atpA* 突然変異体の LB 中の呼吸速度と増殖到達度

先ず、*atpA* 突然変異体の呼吸速度 r_1 は野生型のその約 1.7 倍であるので、曝気槽内の菌体量が 1/1.7 倍での運転が可能であり、内生呼吸も 1/1.7 倍に減少させることができる。図 4 に、式 (25)を用いた、曝気槽内での *atpA* 突然変異体の増殖のシミュレーション結果を示す。

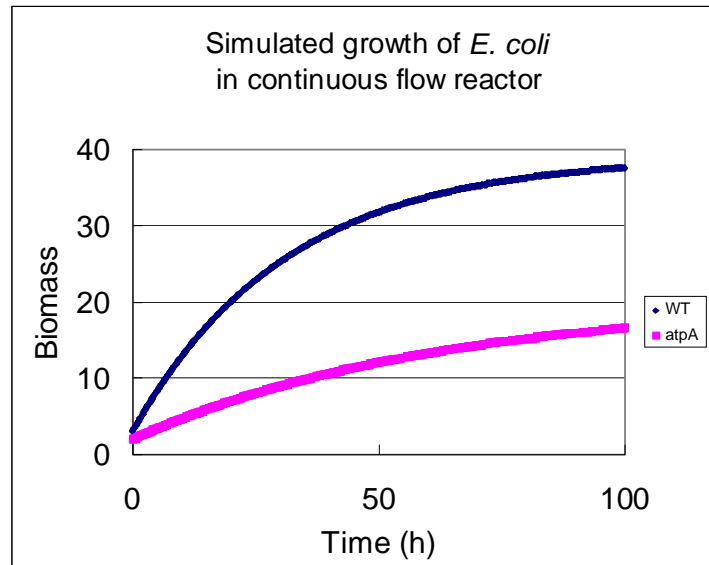


図7 野生型および *atpA* 突然変異体の曝気槽内での増殖のシミュレーション

図7から明らかなように、*atpA* 突然変異体の増殖は、野生型に比べ遅い。このことから、この突然変異体を用いれば、野生型に比べより少ない余剰汚泥を生じるし、余剰汚泥を引き抜く間では、常に野生型より少ない菌体量での処理が可能であることを示している。

atpA 突然変異体の問題点として、コハク酸等の有機酸 (C4-dicarboxylates) の能動輸送が欠損していることが上げられる。すなわち、この株は、有機酸の処理に適していない。これは、大腸菌の持つ、遺伝子発現調節機構によって、*atpA* 突然変異体の中で、能動輸送系タンパク質の発現が抑えられているためである。しかし、*yhiF* という遺伝子の突然変異体では、この発現調節が解除され、C4-dicarboxylates の能動輸送が回復することが報告されている (Boogerd et al. 1998)。よって、*atpA*, *yhi* 二重突然変異体を作成し、その内生呼吸を測定した。また、その株に *glgA* 突然変異を導入し、内生呼吸を測定した。結果を図8に示す。

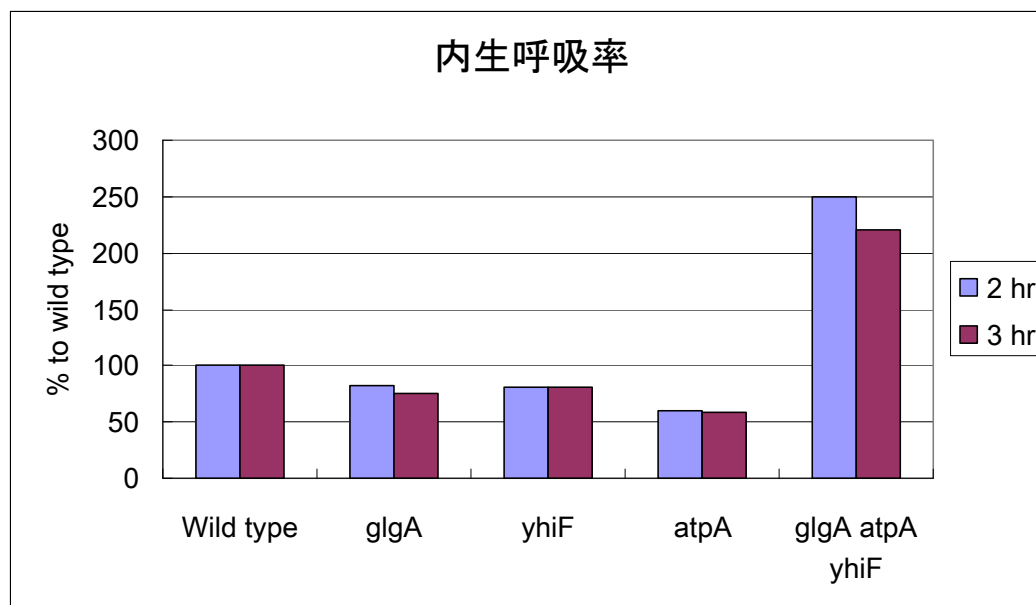


図8 *atpA*、*yhiF* および *glgA* 変異の内生呼吸に対する影響

atpA 突然変異体の内生呼吸は、野生株の半分近くであった。また、*yhiF* の内生呼吸も野生型よりは低かった。しかしながら、*atpA yhiF* 二重突然変異体（データ省略）および、*atpA yhiF glgA* 突然変異体の内生呼吸率は、野生型の約2倍であった。この高い内生呼吸率は、*atpA* 欠損株の細胞が“スリム”であることに起因している。やせているにも関わらず、野生型と同じ呼吸を行うので、乾重量換算での呼吸率を測定すると、野生型よりも高くなるのである。実際、内生呼吸率 (r_2) のみならず、基質存在化での呼吸率 (r_1) も約2倍に上昇している。では、何故 *atpA* のみの突然変異を持つ株では内生呼吸率は低かったのであろうか？ *atpA* 株で内生呼吸が低かったのは、恐らく TCA 回路の基質を効率良く利用できないからと思われる。*atpA* 株に、さらに *yhiF* 突然変異を導入すると、TCA 回路の基質が利用できるようになり、内生呼吸が上昇したと思われる。

以上の結果から、*atpA* 突然変異を持つ株が、内生呼吸低減という観点で、野生型よりも優れている性質を見出せなかった。この結果を受けて、以後、*atpA* 突然変異体を用いた解析は、終了することとした。

2. 1. 2 GC-QMSによる内生呼吸低減効果の定量方法の開発

気体定量用ガスクロマトグラフ・四重極型質量分析計(GC-QMS)による微生物が発生する気体状代謝産物の定量方法の確立を目的に検討した。

曝気効率の高い内生呼吸低減菌の微生物を選抜するために、安定同位体である ^{13}C で標識した酢酸塩やグルコースを微生物の餌として、それが炭酸ガス($^{13}\text{CO}_2$)に回る分とからだ(^{13}C -biomass)に回る部分を測定すること、また、予め ^{13}C を取り込ませていた菌体を用いて、 $^{13}\text{CO}_2$ 発生を測定することにより、いったん貯蔵物質に返還された餌(水質汚濁物質)が酸素の'無駄遣い'のために消費されるかを測定できることが好ましい。安定同位体 ^{13}C で標識された炭酸ガス($^{13}\text{CO}_2$)を検出・定量するための装置として気体定量用GC-QMSを使用できるかを検討した。

1) 研究上GC-QMSに求められる性能

四重極型質量分析計(GC-QMS, Gas Chromatograph Quadrupole Mass Spectrometry)の近年の主な用途は未知な有機物の同定あるいは構造決定である。より大きな分子量を持つ物質の分析への需要が多い。この目的では、分析中の大気の混入はまったくの妨害であるため、気体分子相当の小さな分子量、例えば分子量100以下、は分析から除外する。ところが、本研究では炭酸ガスなど、微生物が発生する気体状代謝産物の定量が目的であり、分析対象は概ね分子量25~50である。したがって、GC-QMSに求められる性能は以下のように特異である。本年度は以下の条件を可能にする設定をGC-QMSに施した。

a) 分子量50以下で質量分析計(QMS)をチューニングする。

四重極型の質量分析計製品は主に高分子量の有機物分析用に設計されている。本実験では極めて低分子量な窒素ガスの分析を行うため、分子量50以下の分子量をもつ気体分子を定量することを目的に、真空ポンプで除かれずに質量分析管内に残存した大気成分を用いて、質量分析計をチューニングできることを確認する。

b) 分子量差1の分子ピークが重ならないこと。

本研究での主要な検討対象である2種類の分子($^{12}\text{CO}_2$, $^{13}\text{CO}_2$)の分子量の差は1であるが、それぞれを定量するためには、重なり合うことなく分離できることが絶対条件である。そのためには質量分析における質量半値幅を <0.3 にすることが必要で、しかもその条件でチューニングできることを実証する。

c) 分析時に起こる大気の逆流（吸い込み）を防止できていることを確認する。

d) キャピラリー・カラムで CO_2 をピークとして分離して 0.1 nmol オーダーの $^{13}\text{CO}_2$ を定量することが必要であるが、これを可能であることを確認する。

2) GC-QMS のチューニング

前述の条件でチューニングを行い、2)で述べた条件を達成できることを確認した。チューニングには真空ポンプで除かれずに質量分析管内に残存した大気成分を利用し、分子量 <50 に対応したチューニングを行うことができ、さらに質量分析における質量半値幅を 0.3 に設定することで分子量差1の天然の安定同位体を検出・分離することが可能であった。すなわち、窒素については天然で最も多い $^{28}\text{N}_2$ およびその次に多い $^{29}\text{N}_2$ （天然の存在比； 0.736% ）を重なり合うことなく分離でき、さらには検量線を用いて定量できることが示された。また、酸素についても $^{32}\text{O}_2$ のほかに $^{34}\text{O}_2$ （天然の存在比； 0.410% ）を分離かつ検出できた。

図9にさまざまな量の大气をGCMSで分析したときの $^{32}\text{O}_2$ と $^{34}\text{O}_2$ のピークエリア値を示した。 $^{32}\text{O}_2$ と $^{34}\text{O}_2$ のいずれの場合もインジェクション量とピークエリアには直線関係が得られた。しかし、この分析条件では0インジェクション外挿点のピークエリアが正の値となり、原点を通らなかったことから、分析の際に大気が混入した可能性が高いことが示された。

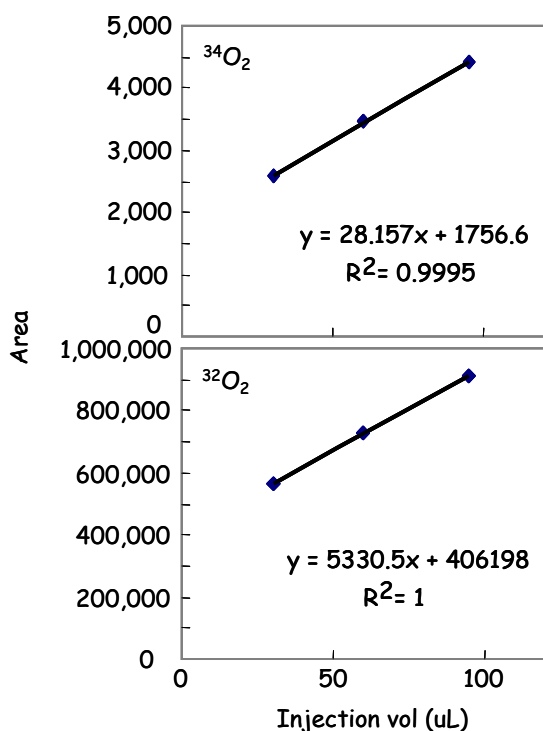


図9 大気 25-100 μl を GCMS で分析したときの $^{32}\text{O}_2$ (下図)および $^{34}\text{O}_2$ (上図)のピークエリア積分値。

3) 炭酸ガス定量方法の確立

気体の定量方法の確立として、亜酸化窒素 N_2O を対象として検量線の作成を試み、上記 3) で述べた分析時の大気の吸い込みがないこと、および 4) で述べた感度を得られるか、また分析の精度とダイナミック・レンジについても検討した。大気の吸い込みの問題は、分析ガス流路の逆流を防止するためのハード的な対策を講ずることにより分析にまったく支障がないレベルに抑えることができた。

ところで、本研究では炭酸ガス(CO_2)が分析の主要な対象であるが、大気中にある程度の量として存在するために(CO_2 発生源から離れた場所で約 300 ppm、都市部で 450 ppm レベル)、GC-QMS の性能としての感度や精度を検討する目的には適していない。そのため、分子量が同じで、2 種類の原子から成り立つ点でも共通する亜酸化窒素 N_2O を対象として検量線の作成を

試みた。この実験で使用した分離条件で CO_2 と N_2O とは GC によって明確に分離できるものの、それらのリテンションタイムは非常に近い (図 10)。また、大気中での分圧がいくら小さいとはいえ、微生物反応によって N_2O が大量に生成する場合があるため、 CO_2 を定量する場合には N_2O も必ず分析しておき、定量対象とするピークが N_2O でないこと、および大量の N_2O が CO_2 の定量を妨害していないことを確認しておく必要がある。

その結果、0.5 nmol の N_2O を十分検出することができ、少なくとも 0.5 - 10 nmol にわたる広い範囲で試料の導入量と分析ピーク面積の間に直線関係が成り立っていることを確認し、定量目的に利用できる検量線を得ることができた。検量線の重相関係数は 0.976 と高かった (図 10)。そのデビエーションの主な原因は試料の導入の正確さにあると考えられ、GC-QMS による分析自体は極めて高い精度があると考えられた。

調整した GC-QMS で CO_2 を分析したところ、独立に分離したクロマト・ピークを与えることが確認され、適切に分析・定量できると考えられた。

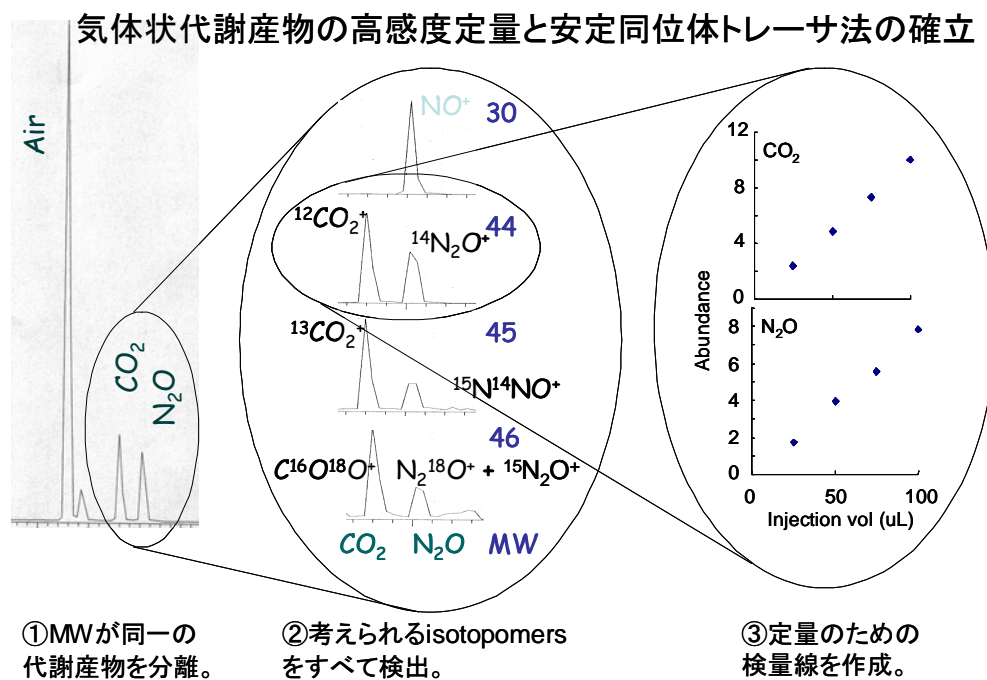


図 10 気体状代謝産物の GC/MS による測定

4) 安定同位体をトレーサーとした細菌の内生呼吸測定方法の確立

この方法を利用して、実際に細菌の内生呼吸の測定を試みた。内生呼吸で発生する CO_2 を ^{13}C をトレーサーとして定量するため、大腸菌（野生株）を ^{13}C で標識した酢酸塩 ($^{13}\text{CH}_3\text{COONa}$) を入れた培地で培養し、大腸菌バイオマスを ^{13}C で標識した。培養後、遠心して ^{13}C で標識したバイオマスを集め、バッファーで洗浄して余分な ^{13}C 化合物を除いた。このバイオマスをリン酸バッファーに内生呼吸による $^{13}\text{CO}_2$ 発生速度ができるだけ精確に測定できるように十分に低い密度で懸濁し、ブチルゴム栓で密閉した小型バイアルに入れた（図 11）。このとき、酸素の供給が不足することがないように、ヘッドスペースを十分大きくし、 25°C でインキュベートし、一定時間ごとにヘッドスペース中の CO_2 を GCMS で定量した。ヘッドスペースには大腸菌の呼吸の結果として 2 種類の炭酸ガス、すなわち $^{12}\text{CO}_2$ と $^{13}\text{CO}_2$ が蓄積されるが、後者は専ら ^{13}C で標識した菌体バイオマスの貯蔵物質に由来する。

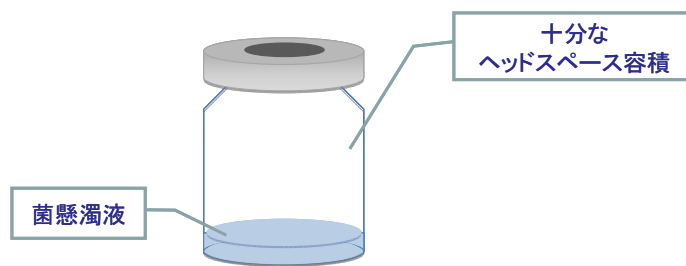


図 11 インキュベーション実験で使用したバイアルの模式図。

実験の結果を図 12 に示した。 ^{13}C -標識菌体をただリン酸バッファーに懸濁して CO_2 放出のタイムコースを求めた実験（図 12 上図）では、若干の $^{12}\text{CO}_2$ の生成が測定されたものの、その速度をおよそ 4.5 倍上回る速度で $^{13}\text{CO}_2$ が生成され、菌体への ^{13}C の標識が十分に行われたこと、およびこの実験系において、内生呼吸 $^{13}\text{CO}_2$ の生成速度として定量できることが示された。

5) 細菌の内生呼吸に対する共存する有機物の影響

ところで、BOD 処理を目的とする廃水処理プロセスにおいては、当然のことながら常に有機物が微生物に供給されている。有機物が供給された条件で内生呼吸が働いているのか否かを知ることは極めて重要である。内生呼吸はエネルギー欠乏状態で検討されることが多かっただけに、こうした検討はわれわれの知る限り十分定量的と思われる検討は過去に行われていない。

ここでの実験では、前節で述べた実験に並行して、リン酸バッファーにグルコースを添加した系での内生呼吸速度の測定も試みた。図 12 の下図に示すように、バッファーにグルコース (^{13}C で標識していない) を添加した場合、グルコース由来の大量ですばやい $^{12}\text{CO}_2$ 生成があったことに加え、グルコース非添加系で見られたと同様に $^{13}\text{CO}_2$ も生成した。このことは、外部からエネルギー減を与えられた場合でも内生呼吸が起こっていることを示す。またその速度はグルコース非添加の場合に比べて若干 (約 15%) 低い程度であり、グルコース添加によって内生呼吸が阻害されたとは認められなかった。

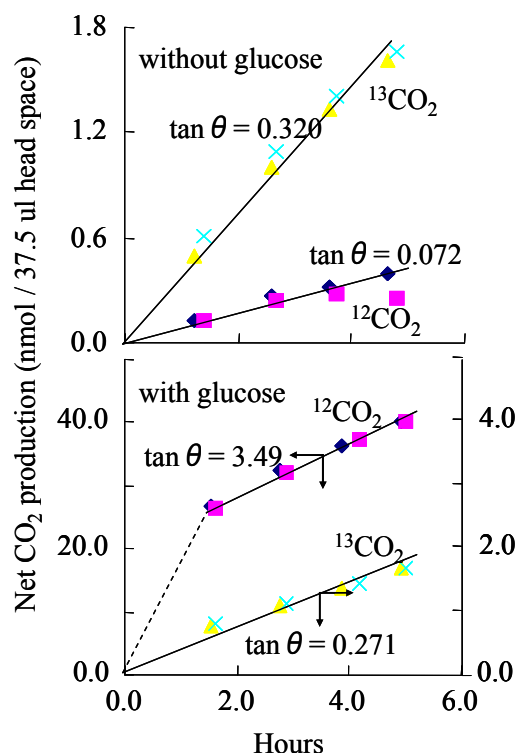


図 12 ^{13}C で標識した大腸菌 (野生株) 菌体の内生呼吸速度の測定 (上図) と、内生呼吸に対するグルコースの影響。内生呼吸は菌体の ^{13}C -標識貯蔵物質由来の $^{13}\text{CO}_2$ の生成速度として測定した。

この結果から、内生呼吸は、宿主細胞が活発に BOD 分解を行っている場合でも、影響を受けない、すなわち、内生呼吸低減菌を分離することは意味があるということを示すことができた。ところで、この解釈に対して、グルコースと BOD では話が違うという質問がでるかもしれない。大腸菌においては、グルコース効果と称されるように、「活発な代謝」のシグナルはグルコースによって発せられる。すなわち、グルコースで影響がなければ、他の化合物での影響もいとかなりの確度で言うことができる。

6) 酸素定量方法の確立

ところで、本研究における最大の目的は酸素の低減である。内生呼吸の低減を貯蔵物質由来の炭酸ガスを測定することで定量的に検討できる実験系を確立できたが、このとき、どれほどの酸素吸収量が低減できたのかを定量的に知ることは本プロジェクトの目的に答えることになる。

そこで、図 11 に示すインキュベーション実験系のヘッドスペース中の酸素を、炭酸ガス分析と同時に GCMS で定量するための方法を確立することにした。大気中の酸素分圧はおよそ 19% と極めて高く、そのため、炭酸ガスの分析用に確立した方法では分析時における外部からの混入が大きすぎ、検量線を作成しても原点を通らなかったことは図 9 に示したとおりである。外部からの酸素の混入箇所は、GCMS のガス流路すべてであるが、殊更、試料注入時の持込量が最も多いのではないかと推定した。

この問題を解決するため、3つの方法を講じることにした。ひとつはガスタイト・シリンジに入った気体試料を通常の試料導入ポートから直接インジェクトすることは止め、6方あるいは8方バルブに取り付けた定量ループを介して導入することである。ただし、このとき、バルブの切り替え用クラッチ板を廻すとともに大気を咬み込むことが避けられない。したがって、クラッチ板の周りがジャケットで覆われたタイプの6方あるいは8方バルブを使用し、ジャケット部分に超高純度 He を流し続けることでバルブ切り替え部を大気から完全に遮断した。さら

に、インジェクション・ポートもプラスチック製の注射等を囲うしてジャケットとし、そこにも超高純度 He を流し続けてインジェクション時の大気の咬み込みを完全に防止した。GCMS に取り付けた自作のインジェクション部の写真を図 13 に示す

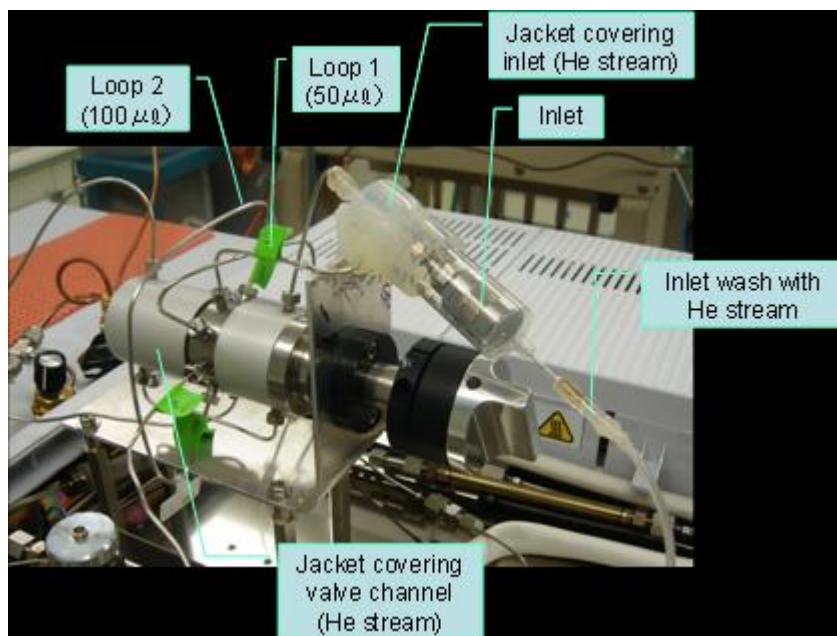


図 13 大気からの酸素の混入を防止するために試作し、GCMS に取り付けたインジェクション部の写真。ジャケット付きの 8 方バルブには 2 つの定量ループを付け、インジェクション・ポートもジャケットで覆った。両方のジャケットには超高純度 He を流し続け、大気との遮断を行った。

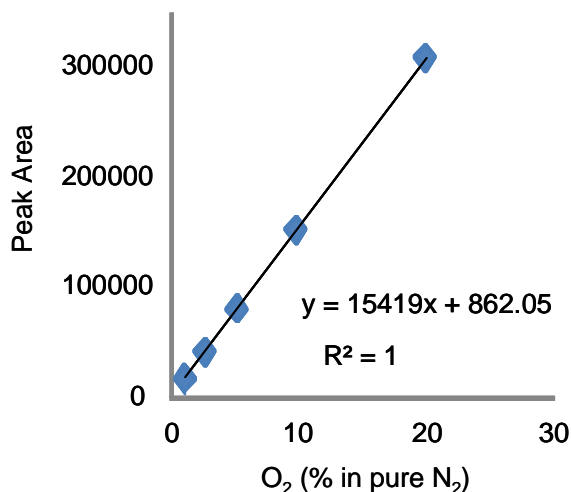


図 14 GCMS を用いて作成した O₂ ガスの検量線。

N₂ ガスをバックグラウンドガスとして調製したさまざまな濃度の O₂ ガス標準試料をガスタイト・シリンジで採取し、図 13 に示したセットアップを介して GCMS に注入した。

図 13 に示した試料導入のためのセットアップを使用して作成した O₂ ガスの検量線を図 14 に示す。ここで分析したのは N₂ ガスをバックグラウンドガスとして調製したさまざまな濃度の O₂ ガス標準試料であり、8 方ループに付属した 2 本の定量ループのうち 1 本の同じループを使ってピークエリアを求めた。調製した O₂ 濃度とピークエリアには高い直線関係があり、しかもほぼ原点を通ったことから、分析時の大気の混入は最小限にできたことが解った。なお、ここで見られた若干の酸素混入は、必ずしも分析時に起こったとは限らず、標準試料の調製の際に起こった可能性がむしろ高いと見ている。

この検量線を得たと同一の分析条件で CO₂ および N₂O も同時に分析することができた(図 15)。

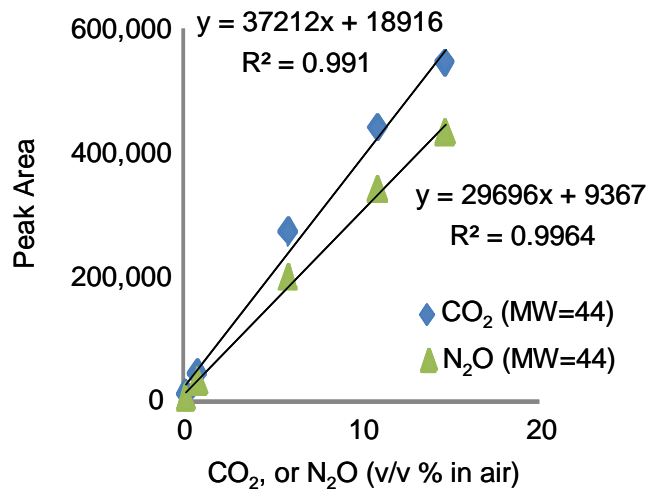


図 15 GCMS を用いて作成した CO₂ と N₂O の検量線。いずれも、さまざまな濃度で標準試料を作成し、図 13 に示した注入口を介して GCMS に導入して分析した。

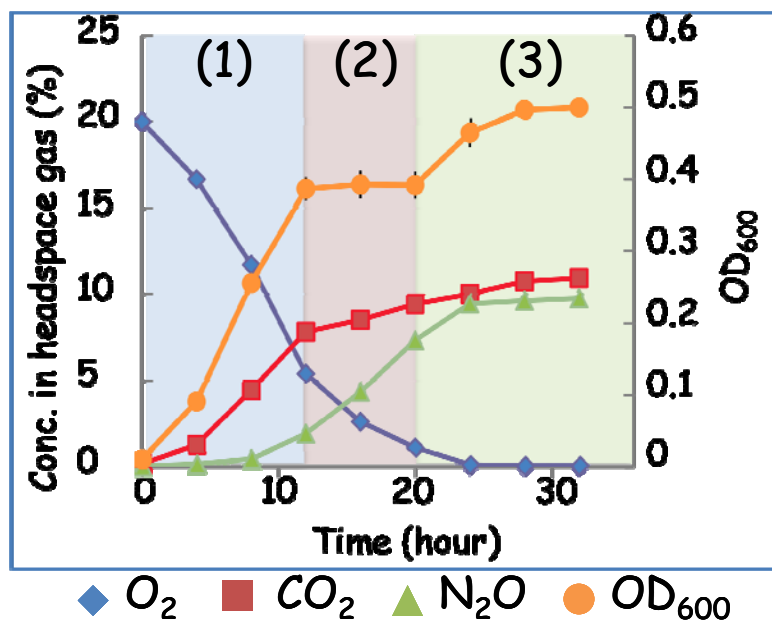


図 16 脱窒細菌 *Pseudomonas* 属の脱窒細菌を密閉したバイアルに入れて培養し、ヘッドスペース中の O₂, CO₂, および N₂O 濃度の経時変化をみたモデル実験の結果。

この分析系を用い、脱窒細菌を密閉したバイアルで培養したときのヘッドスペース中の O₂, CO₂, および N₂O 濃度を GCMS で同時分析するモデル実験を行い、これら 3 つの気体の経時変化

をモニターできることが示された（図 16）。この実験では、酸素濃度の減少によって脱窒が誘導される様子がモニターできたことが示されている。ヘッドスペース中の O₂ 濃度が高いあいだ (phase 1) はバイオマスと CO₂ の増加するものの、O₂ 濃度があるレベル以下になると (phase 2)、バイオマスの増加は停止し CO₂ の増加速度も減じ、N₂O の生成、すなわち脱窒が誘導される。脱窒がいったん誘導されてしまうと再びバイオマスが増加した。このように複数種類の気体状代謝産物をモニターすることにより、さまざまな生命現象を定量的に把握することができる。

2. 1. 3 活性汚泥常在菌の内生呼吸

1) 活性汚泥常在菌の分離

節(1)で、大腸菌の代謝の一部を変化させることにより、内生呼吸を低減できることを示した。では、活性汚泥の常在菌の内生呼吸とはどの程度なのであろうか？これを調べるために、排水処理施設二箇所より活性汚泥を採集（表 4、CH および PE サンプル）、従属栄養細菌を分離した。また、これとは別に、亜硝酸型硝化担体に集積された従属栄養細菌を分離した（表 4、HS および PA サンプル）。

試料名称	MLSS	分離源
CH	aplx. 10,000	千葉 N 下水処理場返送汚泥
PE	aplx. 2,000	千葉 M 厨房排水処理場汚泥
HS	aplx. 50	加熱処理担体（亜硝酸型硝化担体）
PA	aplx. 50	アルカリ処理担体（亜硝酸型硝化担体）

表 4 活性汚泥常在菌の分離に用いた試料

これらのサンプルを生理食塩水にけん濁・希釈後、1/5 濃度の LB Agar（貧栄養寒天培地）に塗布、25℃で約一週間培養した。このプレートに現れたコロニーについて、コロニー形態がなるべく異なるものを選び、全部で 200 株を分離した。これらの株より DNA を分離し、16S rRNA 遺伝子部分配列（約 350 bp）を決定した。分離源が同じで、16S rRNA 遺伝子配列が同じ、かつコロニー形態が類似なものを排除し、32 株を保存した。但し HS サンプルから分離した 6 株の中には、16S rRNA 遺伝子配列がほぼ同じで、かつコロニー形態が類似なものが含まれている。これらの株については、16S rRNA 配列（1,200 bp 以上）を決定し、属および種を推定した（表 5）。

Source = CH

Strain name	Genus species
A2	<i>Bacillus cereus</i>
A3	<i>Bacillus cereus</i>
C2	<i>Bacillus cereus</i>
A4	<i>Bacillus</i> sp.
B5	<i>Enterobacter</i> sp.
A5	<i>Serratia</i> sp.
F2	<i>Sphingopyxis</i> sp.
F3	<i>Sphingopyxis</i> sp.
C1	<i>Sphingopyxis</i> sp
C3	<i>Sphingopyxis</i> sp.

Source = PE

Strain name	Genus species
F6	<i>Acinetobacter</i> sp.
A1	<i>Bacillus subtilis</i>
D2	<i>Comamonas</i> sp.
F5	<i>Klebsiella</i> sp.
F4	<i>Klebsiella</i> sp.
D4	<i>Paracoccus marius</i>
D1	<i>Pseudomonas syringae</i>
D3	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>
C4	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>
F7	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>

Source = HS

Strain name	Genus species
E1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
E2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
E3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
E4	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
E5	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
E6	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>

Source =PA

Strain name	Genus species
E7	<i>Achromobacter</i> sp.
B4	<i>Arthrobacter protophormiae</i>
B3	<i>Arthrobacter soli</i>
F1	<i>Arthrobacter</i> sp.
B1	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
B2	<i>Brevundimonas vesicularis</i>

表 5 四つの試料から分離した菌の属および種名

サンプル CH (返送汚泥) からの分離株は多様性が少なく、*Bacillus* および *Sphingopyxis* が多く分離された。厨房排水処理場汚泥からの分離株には、*Stenotrophomonas acidaminiphila* が多かった。サンプル HS (熱処理担体) からは、*Stenotrophomonas rhizophila* しか分離できなかった。一方、サンプル PA (アルカリ処理担体) からは、*Arthrobacter*、*Brevundimonas vesicularis* 等が分離された。

2) 活性汚泥常在菌の内生呼吸

表 5 に示した分離株について、内生呼吸率 (r_2 : リン酸緩衝液中での呼吸活性) および外生呼吸率 (r_1 : LB 中での呼吸活性) を測定した。そして、酸素有効消費効率、E、を、

$$E = r_1 / (r_1 + 5 \times r_2)$$

の式を用いて計算した。ここで r_2 に 5 を乗じているのは、処理に必要な活性汚泥量の 5 倍量が存在するとの仮定を置いたからである。本研究で作成した、内生呼吸低減大腸菌の酸素有効消費効率は、分離菌のそれを凌ぎ、トップに位置した。

この結果から、活性汚泥中には、酸素有効消費効率が異なるさまざまな菌が生息することが

明らかになった。そして、内生呼吸の高い菌が多数存在し、それが活性汚泥の酸素有効消費効率を下げているものと考えられた。酸素有効消費効率が良いものは、総て Gamma-Proteobacteria に属する菌であった。これらの菌を包括固定化すれば、酸素有効消費効率は約 2 倍上昇し、内生呼吸は 9 割近く減少することが期待される。

2. 1. 4 有用菌の安定維持方法

1) 純粋菌の包括固定化

内生呼吸低減菌を活用するための菌保持方法について検討した。標準菌 (*Pseudomonas sp.* や *Serratia sp.*) の純粋培養液を用いて包括固定化し担体を得た。その担体を Nutrient broth で培養した結果、包括固定化ゲル内部で菌が増殖すること、free の細胞のほうが増殖速度が速いが、菌体保持量は包括固定のほうが大きいことを明らかにした。(図 17) またアルギン酸ソーダで包括固定した担体をさらに PEG で包括固定化する 2 重包括により、菌の漏れが無く、純粋菌を安定して保持できることを見出した。(図 18) これらの手法により内生呼吸低減菌を保持するための幾つかの指針を明らかにすることができた。

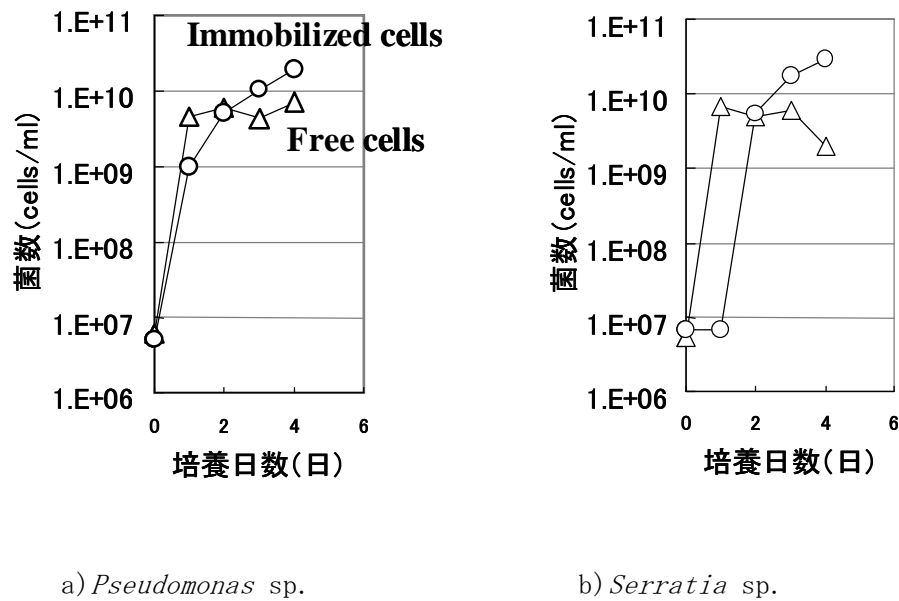


図 17 純粋菌の増殖特性



図 18 2重包括固定化による培養

左下：ゲル内部で増殖した *Serratia* 菌コロニー

右下：培養液には free の菌は漏出せず

さらに、標準菌（酵母とアンモニア酸化細菌）の純粋培養液を用いて包括固定化し担体を得、それぞれの微生物の増殖特性を測定した。先に報告した標準菌（*Pseudomonas sp.* や *Serratia sp.*）と同様に包括固定化ゲル内部で菌が増殖することを確認した。アンモニア酸化細菌は活性汚泥と共存下で固定化するとラグフェーズがなく増殖しやすいことを明らかにした。純粋分離菌を包括固定化するための固定化材料として分子量 4,000 のプレポリマーを選定した。この材料を用いた包括固定化担体の製造は、既設の担体大量生産設備（日立プラントテクノロジー松戸担体製造工場）で生産が可能であることを確認した。

2) 包括固定化担体利用によるコンタミ防止技術

廃水中には多くの雑菌が混在しており、実廃水で固定化菌を用いる場合、雑菌によるコンタ

ミを抑制する手段が必要である。実用可能な手段として担体の加熱処理や酸・アルカリ処理によるコンタミ抑制効果を硝化反応をモデルに検討した。トレーサ菌として硝化細菌群（アンモニア酸化細菌（AOB：Ammonia-oxidizing bacteria）、亜硝酸酸化細菌（NOB：Nitrite-oxidizing bacteria））を包括固定化した担体を用い、NOB 抑制方法を検討した。その結果、固定化担体をアルカリ処理し雑菌増殖を抑制させる手法が効果的であることを見出した。

アルカリ処理を用いることにより、内生呼吸低減菌の維持が容易になることはもちろんであるが、この手法によりこれまで困難であった亜硝酸型硝化を安定に維持できることを見出した。現在長期安定性を継続し試験している。

以上、報告したように内生呼吸低減率では目標値 35% に対し 40% と大幅に低減できる菌を見出した。また内生呼吸低減菌を保持する手段として包括固定化方法での純粋菌の増殖を確認し、固定化材料として分子量 4,000 のプレポリマーを選定した。またコンタミ防止策として、包括固定化担体をアルカリ処理する手法を見出した。これにより内生呼吸低減菌の安定保持が可能になるとともに、亜硝酸型反応が維持できる可能性を見出した。亜硝酸型反応においてはさらに従来の硝酸型反応に比べ酸素量 25% 低減が可能である。

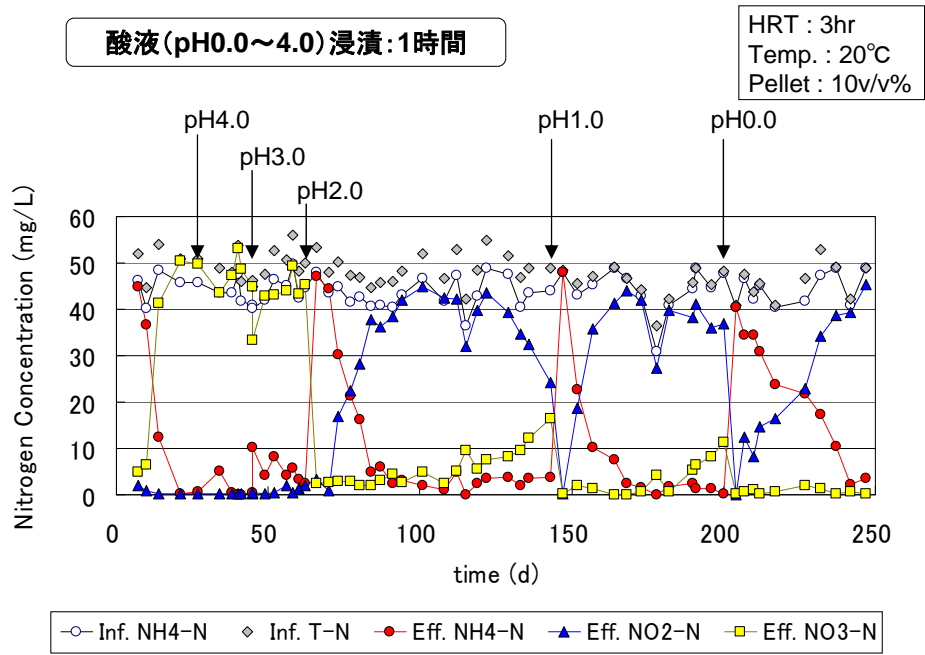


図 19 酸処理担体による無機合成廃水の連続処理

全担体を取り出し各 pH の酸液へ浸漬、中和後返槽

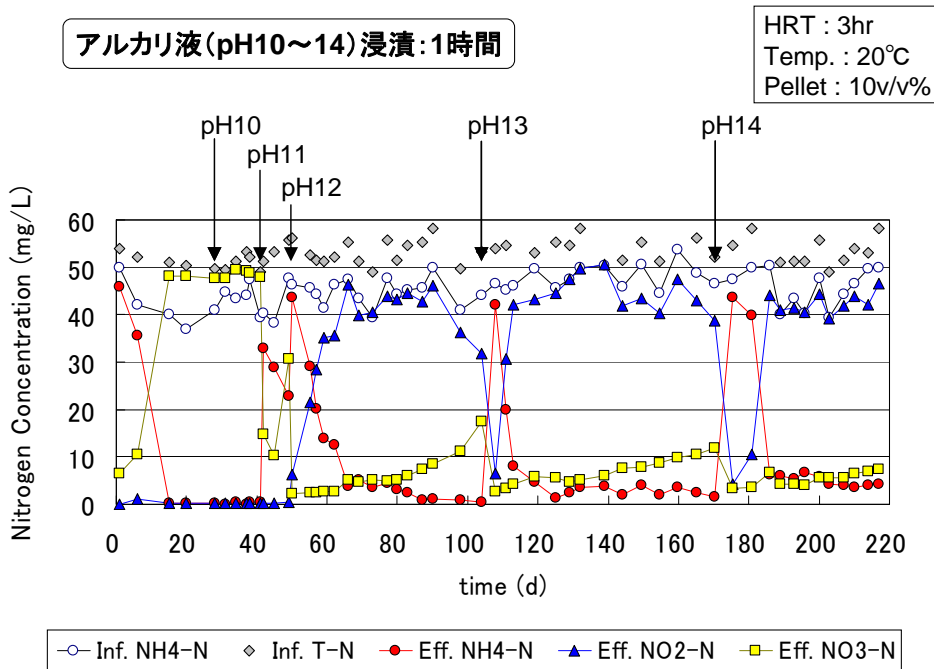


図 20 アルカリ処理担体による無機合成廃水の連続処理

全担体を取り出し各 pH のアルカリ液へ浸漬、中和後返槽

参考文献

- Alonso-Casajús, N., *et al.*, (2006) Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188:5266-5272.
- Boogerd, F. C., *et al.* (1998) *atp* Mutants of *Escherichia coli* fail to grow on succinate due to a transport deficiency. *J. Bacteriol.* 180:5855-5859
- Dauvillée, D. *et al.*, (2005) Role of the *Escherichia coli glgX* gene in glycogen metabolism. *J. Bacteriol.* 187:1465-1473.
- Dawes, E. A., Ribbons, D. W. (1965) Studies on the endogenous metabolisms of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 95:332-343.
- Noda. S. *et al.*, (2006) Alterations of cellular physiology in *Escherichia coli* in response to oxidative phosphorylation impaired by defective F1-ATPase. *J. Bacteriol.* 188:6869-6876.

2. 2 厨房廃水処理用油脂分解バイオフィームの高機能化・安定化のための微生物製剤導入技術の研究開発

(委託先：名古屋工業大学 共同実施先：愛知県産業技術研究所)

2. 2. 1 緒言

レストランや外食産業の厨房廃水に高濃度で含まれる油分は、グリーストラップにより固液分離され、回収後産業廃棄物として処理されている。グリーストラップが悪臭や害虫の発生源であること、分離した油の回収や運搬・清掃等のメンテナンスにかかる労苦やコストなどを考慮すると、グリーストラップ内の油を消滅させるような画期的な技術の確立が外食産業を中心とする産業界から切望されている。

厨房廃水などに含まれる油の除去に微生物を利用するシステムは環境に配慮したシステムであると考えられる。しかしながら、外食産業の厨房排水は通常 1g/L 以上、高いときは 10 g/L 以上もの高濃度の油脂を含んでいるだけでなく、多くのグリーストラップ内の排水の滞留時間は 10 分程度と極めて短い。そのため、多くの自治体が設定している排出目標であるノルマルヘキサン値 30mg/L を、グリーストラップ内の処理だけで常時達成することは至難の業であった。

2. 2. 2 研究概要 (本研究の環境浄化研究での位置付け、研究の動機、類似研究、先行研究、先行技術、比較的詳しく)

これまで、微生物による油脂分解技術の適用が試みられてきた。油脂高分解能微生物として、特に *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp. といった細菌がラボスケールで研究されてきた (参考文献 1-6)。中でも、明治製菓によって分離された *Bacillus subtilis* BN1001 株は、非常に分解能力が高い細菌として知られ、既に微生物製剤として販売されている (参考文献 6)。また Hasanuzzaman らは近年、グラム陰性桿菌、好気性、鞭毛を持ち 15℃~55℃ 下で増殖可能な油脂分解細菌 (*Pseudomonas aeruginosa* T1 株) を北海道の温泉から分離した。この株は廃油を含む様々なタイプの脂肪や油脂を効率的に分解できる (参考文献 4)。また、Matsumiya らは油脂含有廃水処理の効果的なシステムを構築するために、環境中から *Burkholderia* sp. DW2-1 株を分離した。DW2-1 株はサラダ油に対して最も高い分解能を示し、サラダ油、オリーブ油、ごま油、牛脂を 2 日間でそれぞれ 96.7%、92.3%、90.1%、77.4% 分解した。また DW2-1 株は人工廃水中でも非常によく増殖し、90% 以上のサラダ油分解率を示した。連続培養実験においても、DW2-1 株は 7 日間、サラダ油の分解除去効率を維持し続けた (参考文献 5)。しかし、これらの研究はどれも、フラスコまたは水槽を用いた実験結果しか示していない。厨房廃水に含まれる油分の濃度は極めて高く、これらの微生物をもってしても太刀打ちできるレベルにはない。さらに、グリーストラップ内の滞留時

間は極めて短く、仮に分解能力の極めて優れた微生物の開発に成功したとしても、通常は導入した微生物は速やかに流出してしまい微生物を導入する意味がない。そこで現状では、グリーストラップの外に油脂分解槽を設けるしか手段がなく、グリーストラップ内だけで油を処理できる微生物分解技術は全く報告されていなかった。油脂分解槽を別途設けることは、設置場所やコスト面から不可能である場合が多い。それにも関わらず、現在様々な企業がグリーストラップ用の微生物製剤を販売している。しかも多くは、ブラックボックスであり、その内容物や組成、微生物の性質や状態、分解能評価の結果等、科学的な内容を明示しておらず、実際に評価結果があるのかどうかさえ疑わしい商品も存在している。

そんな中、研究代表者はバイオフィームを利用することで、短い滞留時間でも分解菌が流出せずにグリーストラップ内で油を分解除去できる独自技術を開発し、基本特許を出願した。バイオフィームとは、固体表面上に付着した微生物とそれらが分泌する多糖などの細胞外高分子（EPS）から成るバイオマスのことであり、種々雑多の微生物を含む複合微生物系である。バイオフィームはこれまでも廃水処理や水浄化に応用されてきたが、グリーストラップに適用するには、油分解微生物群から成るバイオフィームを利用する必要がある。しかしながら、機能性バイオフィームを構築し維持するには、バイオフィームの微生物コミュニティをコントロールせねばならず、これは、開放系の排水中では容易なことではない。そこで代表者は、バイオフィーム中において油分解微生物を優占化させるために、油分解機能と高付着性を併せ持つ微生物を、微生物製剤として定期的に導入することを考案した。また、これまでブラックボックスとして扱っていたトップダウン型バイオフィームの代わりに、非病原性かつ機能性の高い有用微生物を主として構築した新規の概念であるボトムアップ型バイオフィームを提唱した（図 1）。新規に提唱したボトムアップ型バイオフィームは機能性微生物を適切に操作することで、排水種に応じた制御が可能であり、目的微生物のポピュレーションが高く、また変動に対して迅速に対応可能という優位性を持っているため、グリーストラップ内での油脂処理に最適であると考えられる。本研究では、これを実現するために、厨房廃水処理用油脂分解バイオフィームの高機能化・安定化のための微生物製剤とその導入技術の開発を目指した。

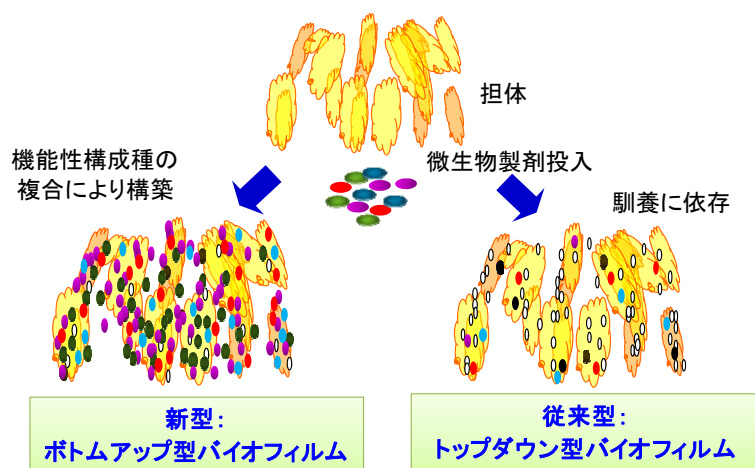


図1. 新型のボトムアップ型バイオフィームと従来型のトップダウン型バイオフィームの形成概念

2. 2. 3 研究目的及び目標（目標の意義、目標の効果、実施計画書の間目標などを記載して、比較的詳しく）

研究目的：高濃度の油脂を含有する厨房廃水をバイオフィームにより効率的に処理するため、グリーストラップに導入する高活性、長期保存性、安全性、操作性に優れた微生物製剤を開発する。これによって、機能性バイオフィームの構造と機能を長期間、安定的に制御する技術を開発する。また、分子生物学的な手法等により微生物製剤およびバイオフィームの品質管理技術を開発する。その概念図を図2に示した。有用微生物群を含む微生物製剤を開発し、それを定期的にグリーストラップに投入することによって、設置した担体にバイオフィームとして固定させ、滞留時間が短い操業時でも投入微生物が流出することなく、油分解処理が行われるシステムである。

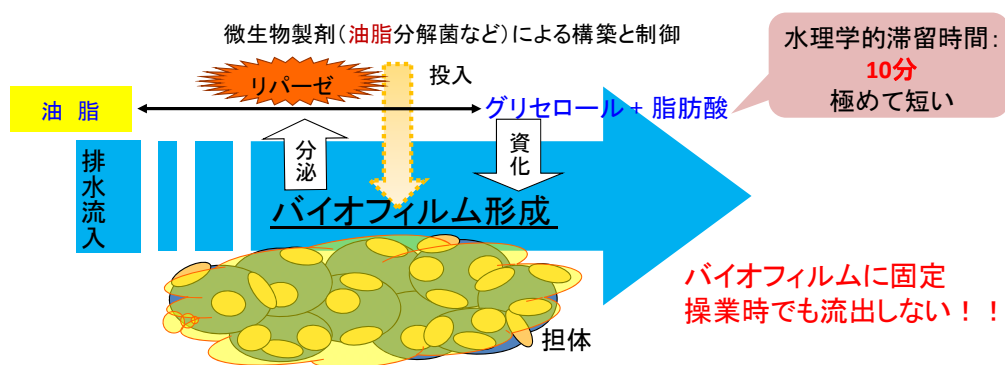


図2. グリーストラップ内の油処理の概念図

平成21年度中間目標

- (1) 厨房廃水中の油脂除去能力が高い非病原性の油脂分解微生物を3種以上分離する。
- (2) 微生物の活性を少なくとも3ヶ月間は維持する製剤化技術を確立する。
- (3) 微生物製剤の品質管理技術として、分子生物学的な手法等によりグリーストラップ内およびバイオフィーム内の目的微生物のポピュレーションを解析する技術を開発する。
- (4) 性質の異なる複数の分解菌を組み合わせることで、負荷や現場の環境変動に強く、分解能力を常に維持できる複合微生物製剤を開発する。さらにその品質管理もできるようにする。
- (5) 油脂の除去効率が、既製品の微生物製剤のみを利用した時と比較して2倍となるような、微生物製剤および機能性バイオフィームを開発する。

2. 2. 4 研究内容（中間目標など達成する手段、実験方法、実験結果、理論的考察、図、グラフ、写真を利用して、比較的詳しく）

前項の目標を達成するための研究の全体構成を図3に示した。



図 3. 本プロジェクトの研究内容および研究体制。括弧内の番号は以下に示す研究内容の項目番号と一致する。

(1) 環境からの油脂分解微生物の分離（名古屋工業大学）

グリーストラップ内の環境は、油脂の加水分解のため pH が 6 程度の弱酸性である。現在市販されている複数のグリーストラップ用の微生物製剤を培養したところ、pH 7 では増殖できたが pH 6 で増殖可能なものを見出すことはできなかった。これではグリーストラップには適用不可能なため、pH 6 において増殖可能な油脂分解微生物を取得することにした。グリーストラップや周辺土壌、食品などから、グリーストラップの環境条件で油脂分解速度の高い微生物の分離を試みた。土壌やグリーストラップからの分離菌は環境に定着しやすく、現場で活躍している菌を分離できる可能性が高い。食品からの分離は項目 5 にて説明する。

油脂分解微生物を分離するために、グリーストラップの環境条件下（pH 6）で無機塩培地にキャノーラ油を唯一の炭素源として 0.2% となるように添加し、集積培養を行った。植え継ぎを繰り返した後に、界面活性剤である Triton X-100 を用いて 1% のキャノーラ油を無機塩寒天培地に均一に分布させたプレートの上に接種し、菌の純粋分離を試みた。その結果、周辺土壌より細菌 1 株 (SL1B1) を得ることに成功した。細菌

SL1B1株について、16S rDNA遺伝子塩基配列を基に系統解析を行い、*Burkholderia arboris* SL1B1と同定した。また、油脂およびグリセロールの資化試験を行った。100 mL容フラスコ中でバッチ培養を行い、コロニー計数法（CFU）を用いて培養液中の菌密度を測定するとともに、pHの変化も調べた。その結果、細菌SL1B1株はグリセロールでは増殖できないが油脂では良好に増殖し、増殖とともに培養液のpHの低下が見られた（図4）。培養液のpHの低下は油脂が加水分解され、遊離脂肪酸が生成した結果と考えられる。また、微生物が油脂を加水分解する能力および脂肪酸を消費する能力は、培地中に残存する油脂およびその加水分解生成物である脂肪酸を薄層クロマトグラフィ（TLC）で分析することにより評価した。その結果、細菌SL1B1株の培養上清から油脂の加水分解代謝物であるオレイン酸が検出された（図4C）。油脂の加水分解に直接に関わるリパーゼの活性は、パルミチン酸と4-ニトロフェノールとのエステルである4-ニトロフェニルパルミテートを基質として用いて酵素反応を行い、エステルの加水分解により生じたp-ニトロフェノールの量を吸光度410nmの測定によって求めることで算出した。細菌SL1B1株のリパーゼ活性を調べた結果、培養24時間目で1.70 U/mL、48時間目で2.76 U/mLと、項目5に後述する分離菌と比較して非常に高い活性を示した。

pH 6に制御した状態でのバッチ培養における微生物の増殖と油の除去過程、リパーゼ活性を調べた結果、論文や特許等で公表されている油脂分解能力が極めて高い微生物と同等レベル以上の速度で油分の除去が可能であった。しかも既報では全てpH 7の条件での分解結果が示されているのに対し、SL1B1株による分解はpH 6の条件下であり、本菌株はグリーストラップに真に実用的であると言え、特許出願に至った（特願2009-079432：弱酸性下で増殖・油脂分解可能なリパーゼ分泌微生物による油脂含有排水の処理方法とグリーストラップ浄化方法及び油脂分解剤）。

さらに、油脂分解能力に直接関わるリパーゼの諸性質は活性の発揮に重要であると考え、pH依存性、温度依存性および熱安定性を調べた。p-ニトロフェニルパルミチン酸を基質としたリパーゼ活性の定量法を用いて分泌リパーゼの至適pHおよび温度を調べたところ、pH 8.0および60℃で最も高い活性を示し、グリーストラップ内の環境条件に近いpH 6および25℃付近においては、至適条件に比べて、それぞれ6.7%および8.4%の活性しか示さなかった（図5）。すなわち、上述のSL1B1の油除去能力は、酵素活性が低い条件下での結果であり、グリーストラップ内の状況によっては、より高い油処理能力を期待できる。また、本酵素は70℃に2時間置いてもほとんど失活しないほどの高い熱安定性を有していた。実際のグリーストラップには、厨房内の洗浄作業等により湯が不定期に流入することを考慮すると、このような熱安定性は微生物製剤にとって重要な特徴であると考えられる。これらの結果より、*B. arboris* SL1B1は、リパーゼを分泌して油脂を加水分解した後に脂肪酸を資化する細菌であることが明らかとなった。

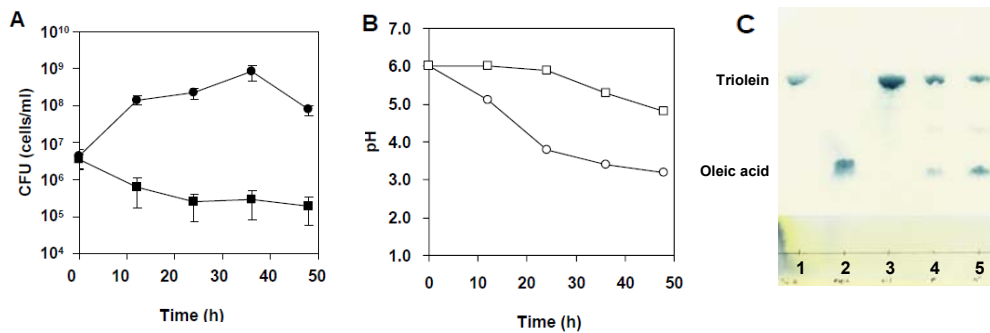


図 4. *B. arboris* SL1B1 株を油脂 (●、○) またはグリセロール (■、□) を唯一の炭素源として、100ml フラスコ中でバッチ培養したときの菌密度 (A)、pH の変化 (B) および TLC による脂肪酸分析 (C) : レーン 1、油脂 (トリオレイン酸) ; レーン 2、オレイン酸 ; レーン 3、ネガティブコントロール (キャノーラ油入りの無菌区) ; レーン 4、酵母 SL1B2 株培養上清 ; レーン 5、細菌 *B. arboris* SL1B1 株培養上清。

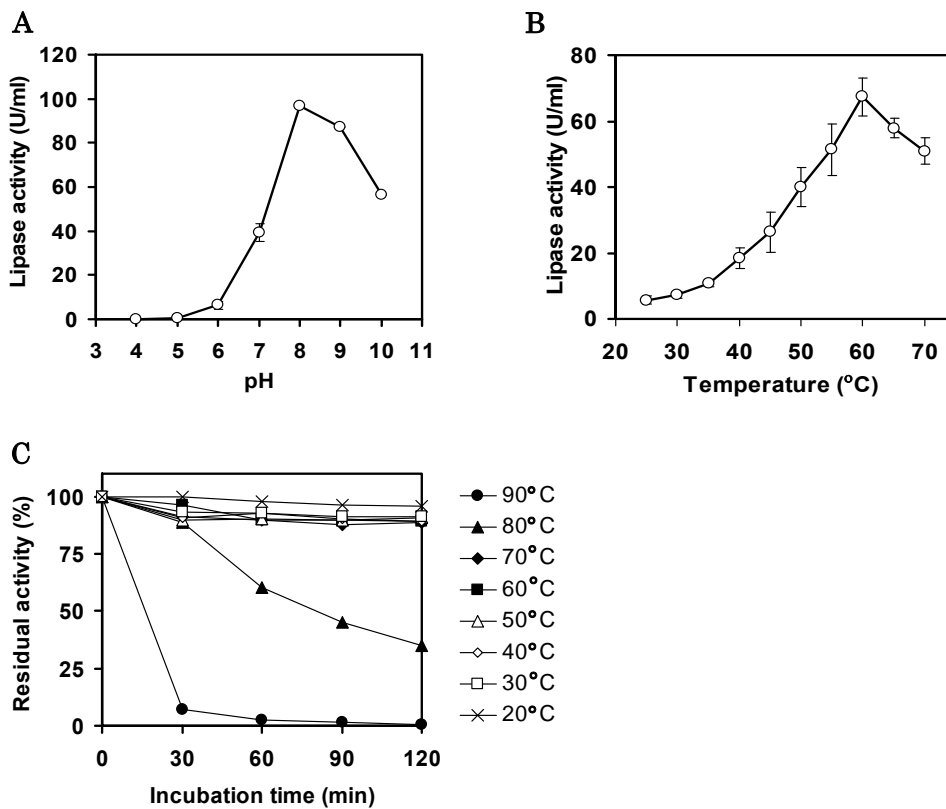


図 5. *Burkholderia arboris* SL1B1 株が分泌したリパーゼの pH 依存性 (A)、温度依存性 (B) 及び熱安定性 (C)。

キャノーラ油を唯一の炭素源とする寒天培地で、*B. arboris* SL1B1 株と一緒に酵母 SL1B2 株も得られた。細菌 SL1B1 株および酵母 SL1B2 株は油脂を含む寒天培地上で同時に生育可能であるが、細菌 SL1B1 株のコロニー周囲には分散した油脂の分解により生じたクリアゾーンが観察されたが、酵母 SL1B2 株のコロニー周囲にはクリアゾーンの形成が見られなかったことから、酵母 SL1B2 にはリパーゼ分泌能力がないと推定さ

れた。また、SL1B2のコロニーはSL1B1のコロニー周辺やクリアゾーン上に形成され（図6）、油脂を唯一の炭素源とする寒天培地上でSL1B2を純粋分離することはできなかった。よってSL1B2は*B. arboris* SL1B1の分泌するリパーゼの作用による油脂の加水分解産物を資化しているものと考えられた。すなわち、油脂を炭素源とする培地上で、細菌SL1B1と酵母SL1B2は共生関係にあると言える。そこで、遊離脂肪酸またはグリセロールを唯一の炭素源とする寒天培地上で酵母SL1B2株の分離を試みたところ、SL1B2株は前者の培地上ではコロニーを形成できないが後者の培地上では単独のコロニーが形成され、純粋分離に成功した。26S rDNAの解析の結果、SL1B2株を*Candida cylindracea* と同定した。

C. cylindracea SL1B2の炭素源利用特性を確認するため、油脂またはグリセロールを炭素源とする液体培地中で培養した。その結果、酵母株は油脂培地でも若干の増殖が見られたが、リパーゼ活性はかすかに認められる程度であった（48時間で0.11 U/ml）。一方、グリセロール培地では非常によく増殖した（図7A）。また、増殖によって培養液のpHが低下することが明らかとなり、酸性物質が生じることが示唆された（図7B）。こうして、*C. cylindracea* SL1B2は、*B. arboris* SL1B1の分泌するリパーゼによる油脂の加水分解によって生じたグリセロールを資化して増殖する共生菌であることが判明した。

以上より、油の分解に関わる2種類の微生物の取得に成功した。これら微生物はバイオセーフティーレベル1のもので病原性は報告されていないが、さらに動物実験に供し、非病原性であることを確認した。よって産業利用可能な安全な微生物である。

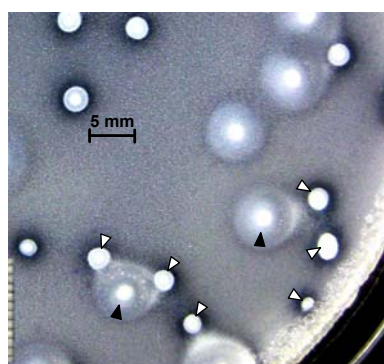


図6. 1%キャノーラ油を含む無機塩寒天培地（pH6.0）上で形成した二種類の菌体コロニー形態写真。△：細菌SL1B1；▲：酵母SL1B2.

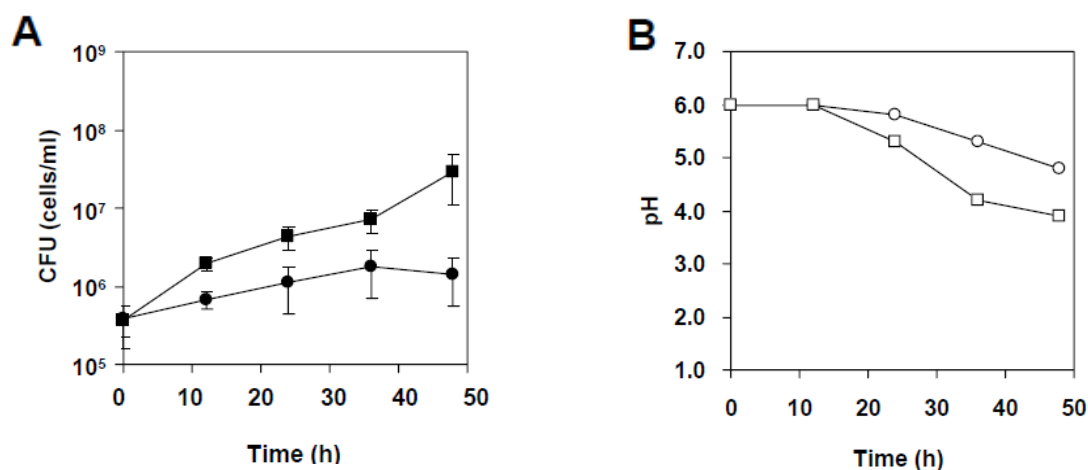


図7. *C. cylindracea* SL1B2株を油脂（●、○）またはグリセロール（■、□）を唯一の炭素源として、100mlフラスコ中でバッチ培養したときの菌密度（A）およびpHの変化（B）

（2）複数の分解菌からなる複合微生物製剤の開発（名古屋工業大学）

性質の異なる分解菌を組み合わせることで、より油脂の分解効果の高い複合微生物製剤の開発を目指し、リパーゼ分泌細菌SL1B1とグリセロール資化酵母SL1B2の混合培養を試みた。比較のため、まず *B. arboris* SL1B1を、pH 6、温度28°C、攪拌速度350rpm、通気量200 ml/minに制御しながら5Lのファーマンターで純粋培養した。3Lの無機塩培地に10 g/Lのキャノーラ油を添加して油脂の分解挙動を解析した（図8A, C, E）。その結果、40時間以内に10 g/Lの油脂および脂肪酸は完全に分解消失した。また、油脂の加水分解によりグリセロールが最大0.9 g/L近くまで蓄積した。先述したとおり、pH 6におけるSL1B1による油分解速度は、論文や特許で公表されているpH 7の条件で油脂の分解能力が極めて高い微生物と同等レベル以上の速度である。

次に同条件で

SL1B1と *C.*

cylindracea SL1B2を混合培養し、油脂の分解実験を行った (図8B, D, F)。その結果、SL1B1株の純粋培養

では残存していたグリセロールが分解されただけではなく、油脂の加水分解速度、脂肪酸の消費速度までも劇的に加速され、24時間

で10g/Lの油脂および脂肪酸が完全に分解消失した (図8)。しかし、SL1B1株と

SL1B2株の混合培養によるリパーゼ活性は純粋培養と違いはな

かった。リパーゼが触媒する油脂の脂肪酸とグリセロールへの加水分解は可逆反応である。培養上清の酵素比活性が同じであるにも関わ

らず混合培養により加水分解速度が上昇したということは、生成物であるグリセロールが消費されたことにより可逆反応が分解反応の方向に向かったことを意味している。このような共生微生物の効果はこれまでに報告例がなく、画期的な新技術であると同時に、グリーストラップに適用可能な微生物製剤の実現に近づいたと言える。よって特許を出願した (特願2009-79299: リパーゼまたはその分泌微生物と加水分解生成物分解微生物との複合効果による油脂含有排水の処理方法とグリーストラップ浄化方法及び油脂分解剤)。また、国際学術雑誌に論文を発表した (参考文献7)。

(3) 微生物製剤・バイオフィルムの品質管理技術の開発 (名古屋工業大学)

グリーストラップに導入した油脂分解微生物が、実際に槽内にどれぐらい存在するか

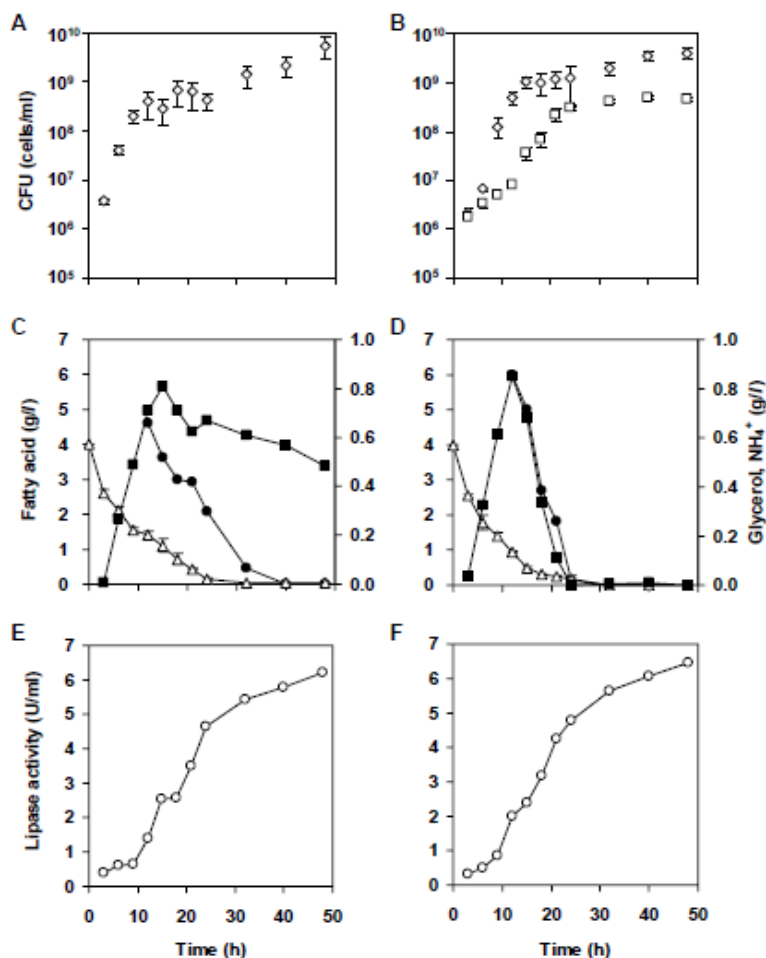


図 8. *B. arboris* SL1B1 の純粋培養 (A, C, E) および *C. cylindracea* SL1B2 との混合培養 (B, D, F) による増殖および油分解特性。
(A), (B) SL1B1 (◇)、SL1B2 (□) の菌密度
(C), (D) 油脂含有および遊離脂肪酸の総量 (●)、グリセロール量 (■) およびアンモニア濃度 (△)
(E), (F) リパーゼ活性

について定量することにより、品質を管理する技術を開発しようというのが、この項目の狙いである。そのため、細菌 SL1B1 株および酵母 SL1B2 株の検出用として、16S rDNA および 26S rDNA を標的とした評価法（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動-DGGE 解析）を確立した。SL1B1 株と SL1B2 株を含む混合微生物製剤を定期的にグリーストラップに導入したところ、ノルマルヘキサン抽出物量が劇的に減少した。そこで、実際にグリーストラップ内に製剤微生物である SL1B1 株と SL1B2 株が存在しているかどうかについて調べた。まず昼間の作業時にグリーストラップ内から試料採取を行い、油分除去のために溶媒処理または加熱処理後に、アルカリ、界面活性剤およびビーズによって微生物を破碎し、ゲノム DNA を抽出した。続いて、16S rDNA を標的としたオリゴヌクレオチドプライマーGC-341F/518R（GC-341F：CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCGG CCT ACG GGA GGC AGC AG; 518R：ATT ACC GCG GCT GCT GG）、および 26S rDNA を標的としたオリゴヌクレオチドプライマーGC-NL1/LS2-ver2（GC-NL1：CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGG GCG GGG GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG; LS2-ver2：CAT TCC CAA ACA ACT CGA CTC）を用いて PCR を行った。この PCR 産物を 30%–55% の変性剤濃度勾配ゲルに供し、得られた DNA バンドの配列を決定した。その結果、油脂分解混合微生物製剤としてグリーストラップに導入した細菌 SL1B1 株および酵母 SL1B2 株は、製剤導入前には確認されなかったが、微生物製剤を 5 日間、毎夜導入した後の翌日の昼間には確認された（図 9）。昼間の作業時には排水の滞留時間は 8 分程度しかないにも関わらず製剤微生物が検出されたことで、導入微生物がウォッシュアウトせずにグリーストラップ内に残留したことが明らかとなり、バイオフィームによる効果が示された。また、油分濃度の極めて高いグリーストラップサンプルでも、加熱処理により微生物コミュニティの解析が可能となり、製剤微生物の存在が確認できたことは、導入微生物が *in situ* で増殖可能であることを示しており、品質管理技術として適用可能である。今後、*in situ* におけるリパーゼ活性を測定し、微生物が *in situ* で存在しているだけでなく目的の活性を有していることを示すことで、信頼性の高い品質管理・保証技術に発展させる。

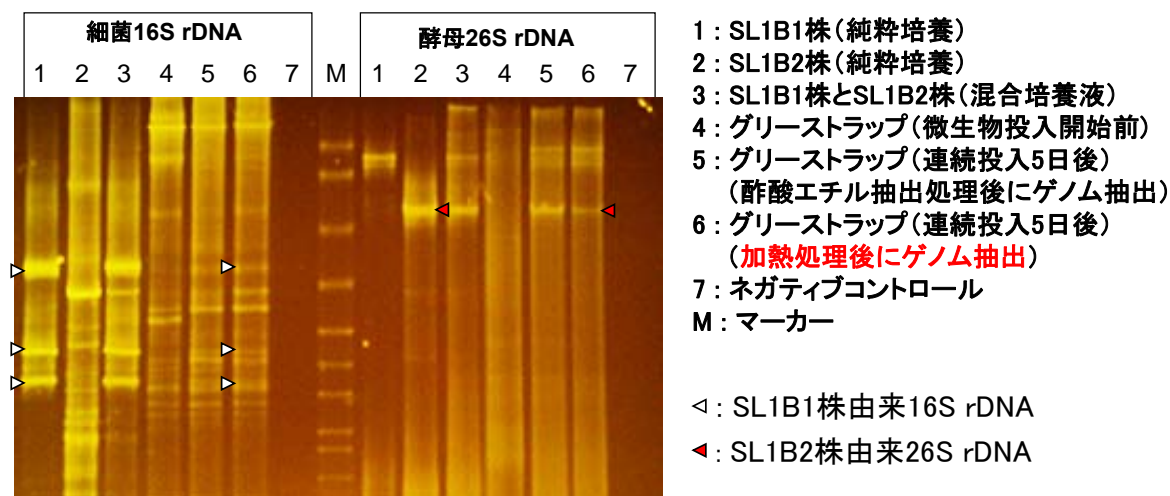


図9. 微生物製剤導入前後のグリーストラップ内試料のPCR-DGGE。

(4) 活性を長期間保持するための製剤化と保存技術の開発 (名古屋工業大学・愛知県産業技術研究所)

本検討項目では、微生物の活性を長期間保持させるため、主として凍結乾燥による保存技術を開発することを目的としている。保存剤の検討を進め、また加速試験法によりその効果を確認してきた。知的財産権の関係上現時点では詳細は述べられないが、ある保存剤の適用により、5℃、7ヶ月の保存期間で、明らかな活性維持効果が認められた。今後は活性の残存率の向上を課題とする。

(5) 食品からの油脂高分解性微生物の分離 (愛知県産業技術研究所)

油脂分解の厨房廃水処理を考えた場合、食品中の脂質が厨房廃水のほとんどと考えられ、発酵に関わる微生物群を利用することで廃水中の脂質も分解できる可能性がある。さらに、発酵食品中に生育する微生物はその製造工程ゆえに高塩濃度や低水分にも耐性を持つことが多く、処理環境の安定しない小規模な廃水処理でも長期にわたる脂質分解活性が得られる可能性がある。微生物の分離源が食品であると安心・安全性をアピールできる可能性もある。

微生物分離源として、しょうゆ諸味、たまり諸味、味噌、魚醬、魚醬搾り残渣、酒盜、キムチ(キュウリ、イカ、白菜)、ふなずし、ドライソーセージ、かつお節、さば節、めじ節、糠床、井水を用いた。微生物分離源を炭素源として油脂のみの無機塩液体培地(pH6.0、30℃)で数回集積培養後、同組成の寒天培地に塗布し、寒天培地上でコロニーを形成する微生物を分離した。特に油脂寒天培地上でクリアゾーンを形成するものを油脂高分解性微生物として分離した。油脂高分解性微生物を、炭素源として油脂のみの無機塩液体培地(pH6)に接種し、30℃で振とう培養を行い、経時的に生菌数と培養上清中のリパーゼ活性を測定した。生菌数はLB培地に形成するコロニー

数で計測した。リパーゼ活性は p-Nitrophenyl palmitic acid を基質とし、pH6、28℃で測定した。油脂高分解性微生物の菌体、もしくは菌体から抽出したゲノム DNA を用い、Prime STAR HS(タカラバイオ(株)製)で PCR 増幅を行った。プライマーには細菌用プライマーセット(株ベックス製)もしくは真菌用プライマーセット(株ベックス製)を用いた。増幅断片 DNA の 500 b p を配列解析し、その結果を BLAST 及び ClastalW を用い、既報のデータベース上の塩基配列と比較した。

その結果、分離源より、原核微生物 12 株、真核微生物 1 株を分離した。培養液中のリパーゼ活性が 100mU/ml 以上のものをリパーゼ高活性、1 日あたりの CFU (cells/ml)増加量が×10CFU 以上のものを高増殖性として評価した。その結果、1 株がリパーゼ高生産かつ高増殖性であった。また、4 株がリパーゼ活性は低いが高増殖性、6 株はリパーゼ活性も低く、増殖も遅い菌であった。分離した微生物株の中にはユニークな油分解挙動を示すものがあり、現在、その有用性等について評価中である。

2. 2. 5 研究成果および残された課題（中間目標などに対する達成度、残された課題、その対応、比較的詳しく）

(1) 厨房廃水中の油脂除去能力が高い非病原性の油脂分解微生物を 3 種以上分離する（名古屋工業大学、愛知県産業技術研究所）

中間目標は非病原性の油脂分解微生物を 3 種以上分離するのに対し、我々は非病原性であると確認できた細菌株 SL1B1 および酵母株 SL1B2 の 2 種類を分離済みであり、残り一種類も、その効果を確認中である。これもバイオセーフティーレベルは 1 で危険な微生物ではないので、中間目標は平成 21 年度の現時点でほぼ達成したと言える。

(2) 微生物の活性を少なくとも 3 ヶ月間は維持する製剤化技術を確立する（名古屋工業大学・愛知県産業技術研究所）

製剤化技術については、保存処理を行った試料と処理前の生菌数を比べた結果、生菌数が 1%まで低下したことが分かった。これは目的の最低レベルでの成果は得られているが、実用化を考慮すると、さらに安価で長期間保存できる添加剤の検討などを行う必要があると考えている。今後、他の保存剤を含む検討を重ね、保存処理後の生菌数の低下を 10%程度までに抑えたいと考えている。中間評価の達成度は 75%程度と自己分析している。

(3) 微生物製剤の品質管理技術として、分子生物学的手法等によりグリーストラップ内およびバイオフィーム内の目的微生物のポピュレーションを解析する技術を確立する。（名古屋工業大学）

品質管理技術に適用可能な解析技術の開発に成功した。よって、中間目標を 100%達成した。

(4) 性質の異なる複数の分解菌を組み合わせることで、負荷や現場の環境変動に強く、分解能力を常に維持できる複合微生物製剤を開発する。さらにその品質管理もできるようにする (名古屋工業大学)

既に分離済みである細菌 SL1B1 株は油脂分解微生物であり、酵母 SL1B2 株は油脂分解代謝物のグリセロールを資化できる微生物である。この二種微生物の混合培養により、油脂分解速度や脂肪酸の消費速度を劇的に加速させることに成功した。よって、中間目標については一応達成したと考えられる。

(5) 油脂の除去効率が、既製品の微生物製剤のみを利用したときと比較して 2 倍となるような、微生物製剤および機能性バイオフィルムを開発する (名古屋工業大学) ラボ実験 :

既存製品の多くは pH 6 の環境で全く製剤の効力を発揮できないため、本技術を既製品と同条件で比較するのは困難である。従来はなかった画期的な技術ができたと言えよう。

実証試験 :

大学生協のグリーストラップは、微生物製剤を導入しないと、ノルマルヘキサン値として 3000~10000 mg/L の油分を排出している。多くの自治体の排出目標値の 30 mg/L の実に 100 倍以上である。中和剤とバイオフィルム担体の存在下で市販微生物製剤の数種類について導入効果を調べたところ、最も効果のあった製剤では一過性の値として 400 mg/L までの低下効果が認められた。一方、中和剤無しで新規開発の微生物製剤を導入したところ、油量の劇的な減少が目に見えてわかるほどになり (図 10)、ノルマルヘキサン値も 60~70 mg/L にまで低下した (図 11)。従来の活性汚泥法の処理能力は 0.6 kg-(BOD)/m³/day であるのに対し、本技術を適用したグリーストラップの処理能力は 60 kg-(BOD)/m³/day と、活性汚泥法と比べ 100 倍効率が良い。また、従来のグリーストラップでの固液分離による油処理効率は約 30% であるのに対し、本技術では約 90% に達し、従来の 3 倍高い効率を有している。また、製剤を導入し続けることで、pH は初期の 5.8 から 7.8 にまで上昇し、リパーゼの至適 pH である 8.0 に近づき、さらに油分解能力を高く発揮できるような状況にまで到達した。製剤を導入し続けることによって、グリーストラップ内の油が分解されやすい環境に変化したことになる。しかしながら、厳冬期には油が固化して分解速度が低下し、ノルマルヘキサン値も 200 mg/L まで上昇した。よって、既製品の一過性値である 400 mg/L (ただし中性条件) と比較すれば、中和処理をしなくても 2 倍 (200 mg/L) の除去効果を示したことになる、中間目標を 100% 達成したと言える。

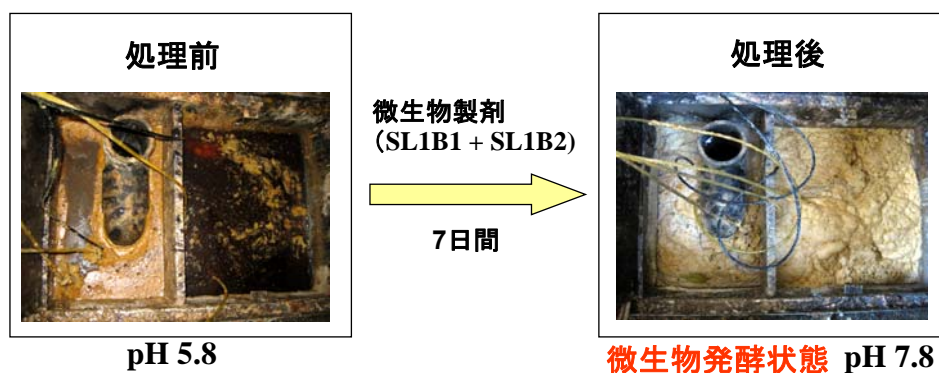


図 10. グリーストラップへの微生物製剤の投与効果

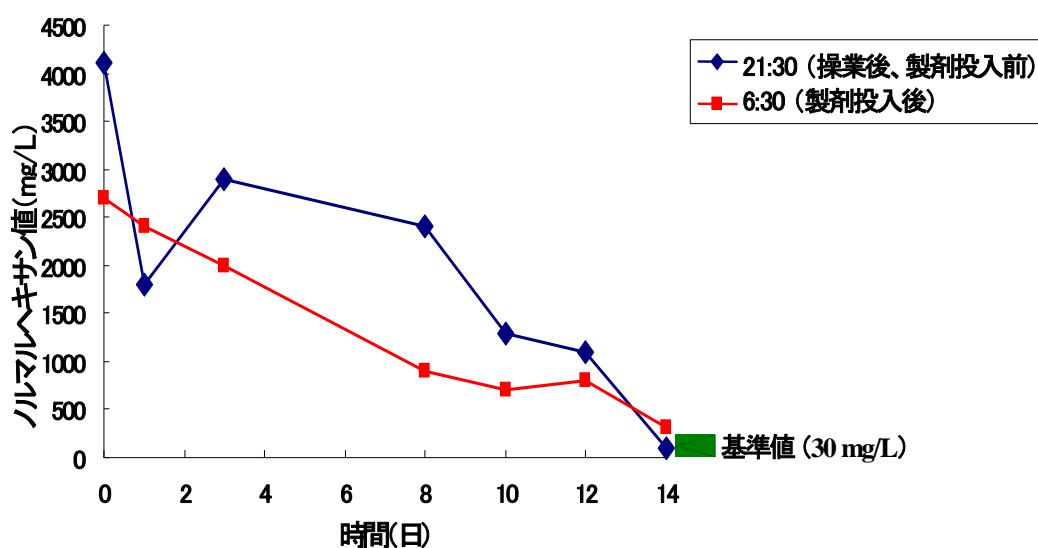


図 11. 製剤導入前後グリーストラップ内のノルマルヘキサン値の経時変化

以上より、現時点で中間目標は保存技術および 3 種類目の微生物の評価を残して、全て達成した。今後の検討項目も明確で、達成目途も立っており、上記二つの課題をクリアし中間目標を完全に達成できると考えている。

2. 2. 6 研究体制 (研究メンバー 役割担当、再委託先、共同実施先などの役割分担など。)

(1) 研究体制スキーム

研究開発組織体制を以下の図に示す。

【委託先】

名古屋工業大学

【共同実施】

愛知県産業技術研究所食品工業技術セン

(②について共同実施)

(2) 研究メンバーおよび役割分担

委託先: 国立大学法人名古屋工業大学大学院工学研究科

登録研究員: 名古屋工業大学大学院工学研究科・准教授 堀 克敏、
特任研究員 李 賢淑、特任研究員 松本慎也

主な担当事業内容: 研究内容の項目である ①、②、③、④

共同実施先: 愛知県産業技術研究所食品工業技術センター

登録研究員: 西田 淑男、石川 健一、半谷 朗

主な担当事業内容: 研究内容の項目である ④、⑤

2. 2. 7 参考文献

1. Okuda, S., Ito, K., Ozawa, H., and Izaki, K.: J. Ferment. Bioeng., 71, 424-429 (1991), Treatment of lipid-containing wastewater using bacteria which assimilate lipids.
2. Wakelin, N. G. and Forster, C. F.: Bioresour. Technol., 59, 37-43 (1997), An investigation into microbial removal of fats, oils and greases.
3. Canler, J. P., Royer, C., and Duchene, Ph.: Water Sci. Technol., 44, 219-226 (2001), Aerobic biological treatment of grease from urban wastewater treatment plants.
4. Hasanuzzaman, M., Umadhay-Briones, K. M., Zsiros, S. M., Morita, N., Nodasaka, Y., Yumoto, I., and Okuyama, H.: Curr. Microbiol., 49, 108-114 (2004), Isolation, identification, and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1.
5. Matsumiya, Y., Wakita, D., Kimura, A., Sanpa, S., and Kubo, M.: J. Biosci. Bioeng., 103, 325-330 (2007), Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment.
6. 高橋 光孝、中津川 直樹、守川 彰、藤崎 克己、福田 正彦、斎藤 安弘、菊池 敏夫、高橋 直世: 特開平 11-179396、(1999)、水処理装置
7. Matsuoka, H., Miura, A., Hori K.: J. Biosci. Biotech. 107, 401-408 (2009), Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation.

2. 3 有用石油分解菌 *Cycloclasticus* のデザイン化に関する研究開発

(委託先：日本大学)

2. 3. 1 緒言

Cycloclasticus 属細菌は、海洋での実際の多環芳香族炭化水素(PAHs)の分解に関与している重要な微生物であり、世界各地より検出されている。同菌は、oligotrophic な細菌であり、通常の生海水からは検出することはできないが、海水に PAHs を添加することにより複合微生物群集の中で優占化し、同時に PAHs の分解が起こる。しかし、石油のような炭化水素の混合物、あるいは、PAHs とアルカン類を合わせて添加すると同菌の優占化は抑制され、PAHs の分解は短期間では起こらないことが知られている。現在、同菌の PAHs 分解力は海洋における強力な浄化手段と考えられることから、これらを有効利用するためには同菌の培養制御技術(デザイン化)が必要である。

一方で、*Cycloclasticus* の培養制御の支持体として見出された S-2 EPS は、*Rhodococcus rhodochrous* S-2 株より抽出された、GlcA-Man-Glc-Gal の繰り返し構造を有する酸性多糖であり、分子内にスアリン酸とパルミチン酸を含むポリフィリックな構造を有している。本 EPS は溶媒耐性能などの多様な生理活性を生産菌だけでなく他の微生物にも付与し、また、強力な界面活性力を有している。

本研究開発では、*Cycloclasticus* が S-2 EPS の投与により複合微生物群集の中で、短期間で優占化し、PAHs の分解が 3 倍以上促進される理由を明らかにし、その情報に基づいたバイオリメディエーションなど産業技術として展開可能な代替手段(物質、培養条件、人工共生系など)を開発することを目標に行った。

2. 3. 2 研究概要

(1)石油汚染環境の研究モデルとしての有用性

石油汚染は、一千種以上の炭化水素化合物の複合汚染であり、汚染域には、アルカンのような短期間で分解消失する成分から多環芳香族炭化水素(PAHs)のように長期間残留する成分など多様な化合物が混在する。一方、石油汚染下にも微生物は棲息するが、汚染域に存在する微生物群はその環境に馴化されたコンソーシアではあるが、そこで発現している石油分解活性が必ずしも汚染浄化に効果的な活性とは言い難い。実際に、汚染域に存在する微生物群全体の活性を高めるようなバイオリメディエーションの手法では分解性の高い成分の分解が速まるだけで、分解性の低い画分は分解されずに残留することが明らかになっており、この残留画分には PAHs およびその誘導体を中心とする難分解性成分が含まれていることが知られている。すなわち石油汚染環境下は、

- ①分解性の異なる物質が同時に存在する環境下であること、
- ②分解には複数の微生物が別々の基質の分解に関与すること、

これら二つの要素が同時に存在する環境であり、効果的な浄化を行うためには、微生物群集の

制御が必要であることから、複合微生物系の培養制御技術を開発する上で有用なモデル環境であると考えられる。

(2) *Cycloclasticus* 属細菌の現状

これまでの研究から、汚染域での流出油の分解には多様な炭化水素分解菌が関与すると考えられていた。しかしながら、提案者は、実際の海洋での PAHs の分解に関与する微生物種は多くなく、中でも *Cycloclasticus* は普遍的に関与している数少ない微生物であることを見出した。本研究の中心となる *Cycloclasticus* は、1995 年にワシントンの Puget Sound から PAHs 分解菌として単離された海洋性の多環芳香族炭化水素分解菌であり、現在、その後の分子生態学的研究により実際の海洋石油汚染下における重要性が認識されつつある微生物である。同菌は、通常の生海水からは検出することは出来ないが、生海水に無機塩類と純品の PAHs を添加することにより複合微生物群集の中で優占化し、同時に PAHs の分解が起こる。石油のような炭化水素の混合物、あるいは、PAHs とアルカン類を合わせて添加すると同菌の優占化は抑制され、PAHs の分解は起こらないが、同条件に *Rhodococcus rhodochrous* S-2 株の細胞外多糖 (S-2 EPS) を添加すると抑制が解除され、同菌の優占化が起こり PAHs 分解も同時に起こる。一方でこれまでの研究成果から同菌の単独培養、および形質転換が可能であり、ゲノム解析も完了し、現在、後続するプロテオーム解析が行われている。

(3) 本研究の環境浄化における位置づけ

現在、*Cycloclasticus* の PAHs 分解力は海洋における数少ない強力な浄化手段と考えられることから、これらを有効利用するためには同菌の培養制御技術(デザイン化技術)が必要である。また学術的にも *Cycloclasticus* を中心とする石油汚染環境下の海洋複合微生物系は、「複合微生物系の培養制御技術の開発」に関する研究の優れたモデルと考えられる。

海洋の石油汚染に関して *Cycloclasticus* 属細菌に注目し研究開発を行なっているグループは世界的にもいくつかあるが、複合微生物系内での分子レベルでの特定の場合が多い。*Cycloclasticus* を中心とする複合微生物系の培養制御に関して、微生物生理学的特徴と関連させながら行っているグループは知られてなく、本研究グループはその中でも特徴的である。

一方で、*Alcanivorax* 属細菌は、海洋性のアルカン分解菌であり、海洋の石油分解菌の中でも *Cycloclasticus* 属細菌と共に重要な微生物群として認識されている。近年、同菌のゲノム解析¹⁾、プロテオーム解析²⁾の結果が公開されたように世界のいくつかの研究グループが同菌を中心とした複合微生物系の研究を行っており、同菌の石油汚染環境下での動態が明らかになりつつある。*Alcanivorax* 属細菌、および *Cycloclasticus* 属細菌は、近年の分子生態学的解析によりその存在が認知されだした菌群であり、また、認識され出した当時は難培養性の微生物であった。その後の研究により、両者共に自然環境中での役割が非常に大きいと考えられ、かつ oligotrophic な生活スタイルを営んでいると考えられている点で共通している。これらは、海洋の石油汚染において、*Alcanivorax* 属細菌がアルカン分解、*Cycloclasticus* 属細菌が PAHs

分解における主要な菌群であり、この分野における世界的な研究開発は、これら両菌群を中心に進んでいる。

(4)当グループによる先行研究

①機能性バイオポリマーの発見

高濃度石油汚染環境下で活躍できる石油分解菌のスクリーニングを行った結果、放線菌の一種である *Rhodococcus rhodochrous* S-2 株が高濃度石油耐性の石油分解菌であることを見出し、同菌の石油耐性には細胞外多糖(S-2 EPS)の生産が深く関与していることを明らかにした³⁾。

S-2 EPS は $[\rightarrow \beta\text{-D-Glc}p\text{A-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Man}p\text{(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{(1}\rightarrow\text{3)-D-Gal}p\text{ }\rightarrow]$ からなる繰り返し構造にステアリン酸とパルミチン酸を含む酸性多糖であり⁴⁾、強力な界面活性作用や溶媒感受性菌への溶媒耐性の付与、保水性や吸湿性の上昇、さらに、微生物細胞表面特性を変化させ外界との相互作用を調節するなどの多様な生理活性をもつ機能性バイオポリマーであることを明らかにした⁵⁻⁸⁾。

②特定石油分解菌の選択的活性化を利用した石油汚染海洋環境の新規浄化法の開発

S-2 EPS は海洋の石油汚染浄化に有効な物質であると考えられたことから、シミュレーション試験を試みた。その結果、S-2 EPS を投与することで、海洋微生物群集構造を変化させ、常法では誘導できない PAHs 分解菌である *Cycloclasticus* の分解能力を選択的に活性化し、石油分解を大幅に促進できることを明らかにした。このことは環境負荷の少ない材料を利用して微生物群集構造を制御し、天然の微生物群がもつ希少な生理活性を誘導・利用できることを示唆しており、新しいバイオリメディエーション法を開発できる可能性が示された⁹⁾。

③ *Cycloclasticus* の分子生態学的解析と微生物生理学的解析の融合

続いて、S-2 EPS による石油分解促進機構を検討するため、*Cycloclasticus* に注目した解析を行った。これまでの研究から、汚染域での PAHs 分解には多様な PAHs 分解菌が関与すると考えられていた。しかしながら、今回、海洋での実際の PAHs 分解に関わっている微生物群を探索した結果、そのような微生物種は多くなく、中でも *Cycloclasticus* は普遍的に関与している数少ない微生物であることが強く示唆された。一方、同細菌は、寒天培地での培養が困難なため、その生理学的性質は未解明な部分が多かったが、スポット植菌法による PAHs 分解活性を指標に MPN 法で解析する新たな培養法(SI-MPN 法)を開発することで同菌の定量的な解析手法を確立した。その結果、S-2 EPS が同菌の PAHs 存在下での生育や PAHs 分解を促進すること、アルカンの存在が微生物群集中での同菌の優占化を抑制することなどの同菌の様々な微生物生理学的性質が明らかになった。これらの結果は、分子生態学的手法により解析されたこれまでの結果を強く支持した。

④ *Cycloclasticus* のゲノム解析と分子育種

ここまでの過程で同細菌が海洋の PAHs の分解において重要な種であることを特定し、さらに実験的検証可能な培養系や解析手法を確立できたことから、ゲノム解析を行い、同時にその情報を利用するための分子育種に着手した。これまでの結果、まず、同菌の形質転換法を確立し、GFP 遺伝子を導入した形質転換体を取得した。これにより、複合微生物系で同菌を視覚的に解析することができるようになった。一方ゲノム解析では、多数の PAHs 分解系遺伝子が確認され、また、後続のプロテオーム解析より同菌は基質により複数の遺伝子を使い分けていることが示唆されてきている。一方で、ゲノム中に複数の破壊された EPS 合成クラスターの存在が確認されたことから、同菌は本来 EPS 生産能を有し PAHs 分解等に利用していたもの予想され、このことは、S-2 EPS の添加が同菌の PAHs 分解を促進するという実験結果と基本的な傾向が一致する。以上のように、現在、ゲノム解析、プロテオーム解析により同菌の特徴的な動態が分子レベルで裏付けられつつある。

(5) 研究の動機

以上のように、*Cycloclasticus* は海洋における PAHs の分解に重要な役割を果たしているが、同菌の生理活性を有効利用するためにはデザイン化技術が必要である。また、本研究開発から得られる培養制御のための支持体の特徴の知見と利用は環境浄化産業的や学術的に大きく貢献できる可能性がある。また、本研究グループには、*Cycloclasticus* 属細菌を総合的に研究するうえで必要な様々な実験技術、知見、経験が蓄積されており、本提案を遂行するための十分な能力があると考えられるため、本プロジェクトにおける研究開発を提案し、研究を行なった。

2. 3. 3 研究の目的および目標

(1) 研究の目的

これまでに得られた同菌のゲノム情報、EPS の化学構造から、S-2 EPS の投与による分解促進機構は、S-2 EPS が石油表面に局所環境をつくり、同菌に棲みかを与え、また、鉄などの PAHs の分解に必須な微量元素の濃度を局所的に高めることで、結果として PAHs の分解をサポートしている、と考えられた。

本研究では、*Cycloclasticus* が S-2 EPS の投与により複合微生物群集の中で、短期間で優占化し、PAHs の分解が 3 倍以上促進される理由を明らかにし(中間目標)、その情報に基づいたバイオリメディエーションなど産業技術として展開可能な代替手段(物質、培養条件、人工共生系など)を開発する(最終目標)。

(2) 検討項目

① 微量元素の獲得に関する検討

一般的な PAHs の好氣的な分解は、初発のダイオキシゲナーゼの酸化反応から始まり、カテコール系物質を経由して分解・資化されるといわれている。これまでのゲノム解析の結果から、

同菌は実に 16 セットもの PAHs ダイオキシゲナーゼを有することが見いだされた。また、後続の PAHs 代謝系関連酵素も複数のセットが見いだされていることから、これらのことが同菌の多様な PAHs 分解活性を支えていると考えられる。一般的に PAHs ダイオキシゲナーゼは、 α 、 β の二つのサブユニットとフェレドキシン、フェレドキシンレダクターゼによって構成され、鉄イオンを要求するといわれている。しかしながら、同菌には鉄イオンを効果的に獲得する既知のシデロフォア等のシステムをゲノム上から見いだすことができない。鉄イオンの獲得は PAHs 分解における必須なステップであることから、新規の獲得システムの存在あるいは、同菌の優占化をサポートする S-2 EPS にシデロフォア様活性があると推測される。以上のことより、本項目では、S-2 EPS の鉄イオンに対する親和性等を中心に、鉄イオンなど微量元素の獲得システムの検討を行う。

②生育の場を確保するための検討

複合微生物系内での優占化を維持するためには、分解基質付近の局所環境下での生育の場の確保が重要であると考えられる。これまでのバイオフィームなどの研究から、局所的なマイクロコロニーの形成は、鞭毛などによる初期吸着から始まり EPS などの生産によるコロニー構造の強固化を経てバイオフィームが成熟していくと考えられている。これまでのゲノム解析の結果から、同菌は初期吸着後の EPS などの生産によるコロニー構造の強固化する段階が出来ないことが考えられる。一方で、S-2 EPS は、脂質を含有する高分子の酸性多糖であることから、石油粒子表面のバイオフィームの構成物として十分に機能すると予測でき、よって、S-2 EPS の投与による同菌の優占化機構は、バイオフィーム形成による局所環境の維持の観点から考えれば十分に理解できる。以上のことから、本項目では、S-2 EPS を介した *Cycloclasticus* と石油との相互作用、特に位置的関係を中心に検討していく。

一方で、優占化の安定維持のためには、他の微生物より早く基質を認識し、近づいていく走化性のようなシステムが必要であると考えられる。鞭毛システムによる運動性については、培養生理、およびゲノム情報から裏付けられていることから、本項目は、PAHs のセンサーシステムについて、ゲノム情報を基に検討を加えていく。今のところ、既知の走化性遺伝子と相同性の高いタンパク質は見いだされていないことから、新規性の高いシステムであると推察される。

③安定・維持技術の開発

Cycloclasticus は強力な PAHs 分解菌であり、その活性は遺伝情報により裏付けられている。そこで、同菌の石油汚染環境下における優占化機構について、現在までの同菌の情報および一般的な知見を総合して考えてみると、その機構は、

- 1)基質の認識と接近
- 2)基質への吸着と安定した生育の場の確保
- 3)基質分解のための各種補助因子の獲得
- 4)分解活性の発現

の大きく四段階に分けて考えることができる。このうち、接近に関連する運動性、および分解活性の発現については、既に多くの情報があるため、上述した基質の認識、基質への吸着と安定した生育の場の確保、基質分解のための各種補助因子の獲得に関する検討を行うことにより同菌の優占化を検討する上で必要な情報が揃うと考えられる。これらのことを基に人為的導入時における同菌の安定・維持するための技術の開発を行う。本提案における仮説が正しいとすると、最も重要な部分は局所環境における生育の場と基質分解の補助因子の獲得を同時に行っていると予測される S-2 EPS のような培養制御の支持体のスクリーニングと高機能化である。これに関しては、現在のところ、

5)既存の S-2 EPS の修飾・改変等による高機能化

6)新規培養制御の支持体のスクリーニング

7)*Cycloclasticus* の優占化をサポートするための微生物群の探索

の三つの研究の方向性が考えられる。この点に関しては、現段階で不確定な要素が多いため、(1)および(2)の検討項目の結果を受けて、本項目の開始する平成 22 年度の時点での具体的な方向性を決定する。必要に応じてプロジェクト内外での研究協力や組織改変などを行う予定である。

また、本技術開発の応用段階における対象は、現在のところ海洋の石油汚染、高塩濃度の芳香族化合物分解活性汚泥などをイメージしており、これについても、プロジェクト内外での研究協力を通じて発酵槽スケールまでの拡大を考えている。

(3)研究目標の意義

分子生態学的手法の発達とバイオフィルム、共生、バイオリメディエーションなどのキーワードと関連し、複合微生物系を対象とした研究は非常に多くなってきた。しかしながら、本研究のように、①再現性のある検証可能な複合微生物系で、②その中心となる微生物の培養を可能とし、③DNA レベルだけでなく微生物生理学的検証が可能であり、さらに④ゲノム情報を利用できるケースは非常に少ない。本研究の材料である *Cycloclasticus* を中心とする石油汚染環境下の海洋複合微生物系は非常に優れたモデルであり、本研究の最大の特色であり、新規的・独創的な点である。

現段階で考える限り、*Cycloclasticus* のもつ PAHs 分解活性は、海洋に存在する最も有用な PAHs 浄化力であると考えられるが、通常の海洋複合微生物群集の中では希少なものである。これまでの研究において、培養制御の支持体として見出された EPS は、環境負荷の少ない微生物の生産する機能性物質であり、このような物質を利用して微生物群集構造を制御し、環境固有の微生物群集がもつ有用な生理代謝活性を誘導・利用する技術および考え方は、例えば、本プロジェクトで主たる対象として考えられている活性汚泥環境など、他の複合微生物群を対象とした技術にも応用でき、かつ、21 世紀に求められるクリーンな技術開発に十分応えられるものに発展することが期待できることから、産業技術として利用価値の高いものと考えられる。

2. 3. 4 研究内容

(1) プロテオームの高効率化

S-2 EPS の投与による同菌の PAHs 分解促進機構を分子レベルで解明するため、これらのゲノム情報を利用した高効率のショットガンプロテオームシステムの構築を試みた。ショットガンプロテオーム解析では、多次元 LC- nanoESI-MS/MS 解析の前段階に相当する SDS-PAGE のゲルからのペプチド断片の抽出の過程を効率化することが重要であるため、自動アミノ酸抽出装置を平成 20 年 2 月に導入した。また、アミノ酸の相同性解析の部分を行う専用ソフトウェアである Bioworks をバージョンアップした。

その結果、全体の解析時間効率的に 2 倍、ペプチド抽出処理の時間効率的に 4 倍、MS/MS 解析の単位時間あたりの処理数で 6 倍、相同性解析の単位時間あたりのサンプル処理数で 6 倍の高効率のショットガンプロテオームシステムを構築した。

(2) 微量元素の獲得に関する検討

① *Cycloclasticus* の生育に対する鉄源の影響

Cycloclasticus のゲノム情報を微量元素の獲得という観点から解析した結果、*Cycloclasticus* は *Alcanivorax* に比べ、鉄、硫黄などのトランスポーター系遺伝子が少なかったことから、この部分に関して S-2 EPS が何らかのサポートをしていると推測された。各種微量元素のスカベンジングは同菌が優占化するための重要なステップであり、特に PAHs 初期酸化酵素には鉄が必須であることから、今回、同菌の PAHs 分解に対する鉄の影響について検討を加えた。

KEGG データベースによると一般的な鉄の取り込みに関するトランスポーターは主に 3 種類と考えられている。しかし、*Cycloclasticus* sp. S-4 のゲノム情報からは、複合鉄を取り込む FhuA、B、C のセットしか見出すことはできなかった。そこで、鉄源として二価、三価の塩化鉄およびクエン酸鉄を用い、ピフェニルを炭素源とした海水培地での同菌の生育に対する鉄源の種類の影響を検討した(図1)。

その結果、クエン酸鉄(O)、FeCl₃(●)を添加した条件では、S4 株は良好な生育を示したが、FeCl₂(△)を添加した条件では、培養初期の生育が著しく抑制され、定常期に達するまでの他の条件より多くの時間を要した。また、鉄源を添加しない条件では、S4 株は増殖せず(▲)、経時的に生菌数が低下した。

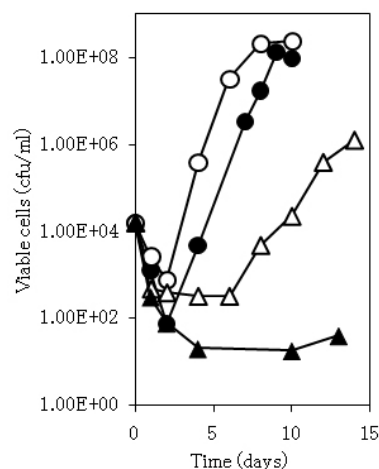


図1. *Cycloclasticus* の生育に対する鉄源の影響

② ショットガンプロテオーム解析

上述したように、ゲノム情報からは同菌は有機鉄を取り込むトランスポーターしか見出すことが

できなかったことから、有機鉄しか利用できないと考えられた。しかし、実際の培養試験の結果から同菌はイオン化鉄も利用できることが明らかとなった。このことから、FhuABC 以外のトランスポーターも鉄の取り込みに関与しているものと考えられたため、ショットガンプロテオームによるトランスポーターの同定を試みた。

培養は、鉄源として二価、三価の塩化鉄およびクエン酸鉄を用い、ピフェニルを炭素源とした海水培地で行い、定常期に達した菌体を回収し、そこからタンパク質を抽出した。その後、サンプルを SDS-PAGE に供した。その結果、供試した条件で SDS-PAGE の泳動パターンに変化は見られなかった。そこで、ゲルを切り出し、ゲル内でトリプシン消化したペプチドのアミノ酸配列を多次元 LC-nanoESI-MS/MS 解析で同定した。

その結果、各条件で約 300 のタンパク質を同定した。そのうち、全ての条件で共通していたものは 168 存在し、その多くは必須遺伝子であった。これらの結果について、鉄をキーワードにしてさらに解析したところ、FeCl₃ を添加した条件では FeoB のタンパク質が検出された。そこで、このオペロンをさらに詳細に解析したところ、二つ上流に位置する ORF982 が FeoA であることが示唆された。そのため、同菌が FeoA、B のシステムを有することを見出し、S4 株は、同システムによりイオン化鉄を取り込んでいる可能性が示唆された。

(4) 基質への吸着と安定した生育の場の確保

S-2 EPS はマンノース、グルクロン酸、グルコース、ガラクトースの 4 糖の繰り返し構造からなり、ステアリン酸とパルミチン酸をもつ酸性多糖であり、強力な界面活性力を有している(図 2)。これまでの研究から、脂質部分が石油の分散に関与していることが明らかとなっている。今回、構成糖のグルクロン酸が有するカルボキシル基が微量元素の局所的な高濃度化と取り込みに関与すると予想し、S-2 EPS を還元することで同菌の優占化が抑制されるか否かを検討した。

S-2 EPS を物理的に剥離し、遠心にて上清を回収した後、各種酵素処理を行い透析した後、凍結乾燥により回収した。これらのサンプルについて、DEAE カラム等で精製し、水酸基を保護しながら NaBH₄ で還元し、還元物を取得した。取得したサンプルは HPLC により確認した(図 3)。この結果、還元率 38%のサンプルを取得した。

続いて得られた還元物を使用し、複合微生物系での *Cycloclasticus* の優占化に対する影響を検討した。培養条件は微生物源として生の海水を用い、炭素源としてフェナントレンとヘキサデカンを加えた条件で行なった(図 4)。

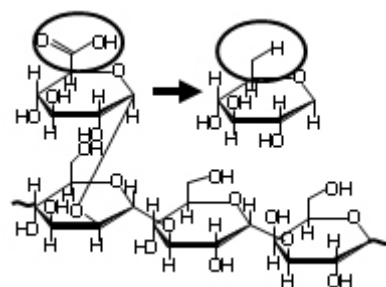


図 2. S-2 EPS の糖の繰り返し構造とグルクロン酸の還元

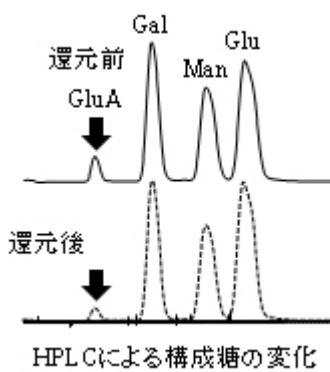


図 3. S-2 EPS のグルクロン酸の還元による構成糖の変化と還元率

その結果、S-2 EPS を添加しなかった条件では(レーン左)、同菌の優占化が抑制されたが、S-2 EPS の添加によりその抑制は解除された(レーン中央、矢印部分のバンド)。この傾向は基本的にこれまでの結果を支持している。一方で S-2 EPS の還元物を添加した場合には、無添加条件と同様に *Cycloclasticus* の優占化は解除された(レーン右)。ここから、S-2 EPS のグルクロン酸に含まれるカルボキシル基が同菌の複合微生物系内での優占化に重要であることが示された。

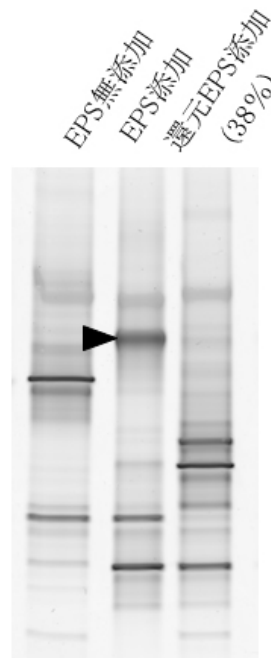


図 4. S-2 EPS と還元物の *Cycloclasticus* の優占化に対する影

2. 3. 5 研究成果および残された課題

(1)これまでの成果のまとめ

以上、これまでの研究開発において、以下のような成果が認められた。まず、*Cycloclasticus* のゲノム情報を検討し、同菌が鉄の取り込みに関して他の微生物よりも不利な状況にあることを見出し、ゲノム情報を利用した高効率のショットガンプロテオームシステムを確立した。

続いて、2. 1. 4 (3)基質分解のための各種補助因子の獲得の検討項目では、*Cycloclasticus* がイオン化鉄を利用できることを明らかにし、また、添加する鉄の価数と同菌の生育に相関があることが示唆された。一方で、 FeCl_2 添加条件での培養初期における生育抑制は、S-2 EPS の添加により解除されたことから、S-2 EPS が同菌の鉄の取り込みに関して重要な役割を果たしていることが示唆された。後続のプロテオーム解析の結果、鉄の取り込みに関与すると考えられる新たなトランスポーターを見出した。

2. 1. 4 (4)基質への吸着と安定した生育の場の確保の検討では、S-2 EPS のグルクロン酸に含まれるカルボキシル基が同菌の優占化に重要であることが示された。カルボキシル基は、鉄との相互作用が考えられることから、(3)の結果と総合すると、S-2 EPS が鉄の局所的な高濃度化と取り込みに関して *Cycloclasticus* をサポートしていることが考えられた。

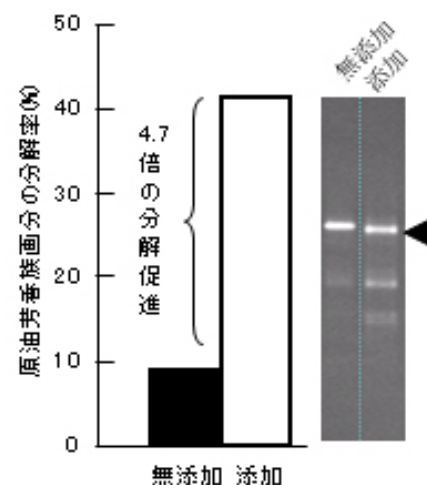


図 5. S-2 EPS の投与による *Cycloclasticus* の優占化と PAHs の分解促進

(2)中間目標に対する達成度

デザイン化プロジェクト全体の中間目標である「特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発」に対しては、S-2 EPS の投与により、天然の海水にマイナーなポピュレーションとして存在する *Cycloclasticus* を PAHs 分解複合微生物系の中で主要

なポピュレーションとして優占化させる技術を既に開発しており、その効果は、培養系に汚染源として原油芳香族画分を添加した場合に 4.7 倍の分解率を示し(図 5)、フェナントレンとヘキサデカンの組み合わせによる原油芳香族画分を単純化した系において 5.2 倍の分解率を示したことから、中間目標である「約 3 倍の高効率化」は十分に達成されている(現時点での達成率 100%以上)。

本研究開発の中間目標である「*Cycloclasticus* が S-2 EPS の投与により複合微生物群集の中で、短期間で優占化し、PAHs の分解が 3 倍以上促進される理由を明らかにする」に対しては、ゲノム情報より、*Cycloclasticus* が鉄の取り込みに関して、他の微生物よりも不利な状況にあると考えられることを見出し、S-2 EPS が鉄の局所的な高濃度化と取り込みに重要な役割を果たしていることを示唆した。そして、この機能には、S-2EPS 分子中に含まれるグルクロン酸のカルボキシル基が重要であることを示した。またショットガンプロテオーム解析より、アノテーションの段階では見いだされなかった鉄の取り込みに関する新たなトランスポーターを見出した。以上の結果から、これまでは明らかでなかった S-2 EPS の投与による PAHs 分解促進機構が分子レベルでの証拠を基に明らかとなり、その情報は、後続の(中間評価以降の)研究開発に非常に有用であると考えられた(現時点での達成率 90%)。

(3)残された課題とその対策

現段階で、S-2 EPS の投与による PAHs 分解促進機構について、カルボキシル基と鉄、カルボキシル基と *Cycloclasticus* の複合微生物系内での生育、PAHs の分解、および鉄と *Cycloclasticus* の生育、分解との関係は大筋で明らかとなっている。今後は、これら三者の関係を純粋培養系と複合微生物系の二つの条件で完全に明らかにすることを目標に平成 21 年度の研究を行なっていく予定である。

具体的には、S-2 EPS、S-2 EPS の還元物、さらに S-2EPS の還元物を酸化したサンプル(一度還元され水酸基になった部分を再度酸化しカルボキシル基にしたもの)の三種類のサンプルを用意し、鉄との親和性、*Cycloclasticus* の生育、PAHs 分解について検討することで、研究開発で重要な要素となっているカルボキシル基、鉄、*Cycloclasticus* の三者の関係を明快に実験的に証明できると考えている。現在全ての実験システムは整っており、また、材料となる S-2 EPS の誘導体も揃っていることから、平成 21 年度内に中間目標が 100%達成されると考えている。

2. 3. 6 研究体制

研究開発責任者

岩淵範之(日本大学生物資源科学部専任講師):研究立案と総括および各種検討項目を担当

研究開発従事者

荻原順(日本大学生物資源科学部専任講師):ショットガンプロテオーム解析の高効率化とシス

テムの維持を担当

竹石英伯(日本大学生物資源科学部博士研究員):微量元素の獲得に関する検討および基質への吸着と安定した生育の場の確保を担当

2. 3. 7 参考文献

- 1) S. Schneiker, V.A. Martins dos Santos, D. Bartels, T. Bekel, M. Brecht, J. Buhrmester, T.N. Chernikova, R. Denaro, M. Ferrer, C. Gertler: *Nat Biotechnol*, **24**, 997-1004 (2006)
- 2) J.S. Sabirova, M. Ferrer, D. Regenhardt, K.N. Timmis and P.N. Golyshin: *J Bacteriol*, **188**, 3763-3773 (2006)
- 3) N. Iwabuchi, M. Sunairi, H. Anzai, M. Nakajima, S. Harayama: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5073-5077 (2000)
- 4) M. Urai, H. Anzai, J. Ogihara, N. iwabuchi, S. Harayama, M. Sunairi, M. Nakajima: *Carbohydr. Res.*, **341**, 766-775 (2006)
- 5) M. Urai, H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Sunairi, M. Nakajima: *Actinomycetologica*, **16**, 26-31 (2002)
- 6) N. Iwabuchi, M. Sunairi, H. Anzai, H. Morisaki, M. Nakajima: *Colloid and Surface B: Biointerfaces*, **30**, 51-60 (2003)
- 7) M. Urai, H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Sunairi, M. Nakajima: *Actinomycetologica*, **18**, 15-17 (2004)
- 8) T. Aizawa, A.B. Neilan, I. Couperwhite, M. Urai, H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Nakajima, M. Sunairi: *Actinomycetologica*, **19**, 1-6 (2005)
- 9) N. Iwabuchi, M. Sunairi, M. Urai, C. Itoh, H. Anzai, M. Nakajima and S. Harayama: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2337-2343 (2002)

2. 4 高濃度微生物保持DHSリアクターによる溶存メタン・亜酸化窒素温室効果ガスの処理およびリン回収技術の開発

(委託先：広島大学)

2. 4. 1 緒言

嫌気性廃水処理は消費エネルギー量が少ない事などから、CO₂ 排出量削減の切り札として地球温暖化防止の観点からも注目され、その開発が進められている。しかしながら、嫌気性処理は温室効果ガスであるメタンの大気中への放出源となっている事も事実である。また、窒素除去プロセスを始めとした下排水の高度処理の普及にともなって、硝化、脱窒処理の際に発生する亜酸化窒素が問題視されている。特に近年、新規な窒素除去プロセスとして anammox 反応が注目されているが、このための部分硝化過程や硝化・anammox 一槽型処理過程で N₂O が生成され大気に放散される。これらは温室効果の非常に高いガスであり、嫌気性処理や anammox プロセスは環境にやさしい技術と思われているようであるが、トータルの地球環境負荷を鑑みると、溶存メタンや N₂O の大気放出防止がなされなければ、決してやさしい技術とは言えない。また、余剰汚泥が発生しない処理システムは非常に好ましい排水処理方法であるが、余剰汚泥が発生しないという事は一般的に用いられているリン蓄積細菌を利用するリン除去プロセスが使用できないという事である。したがって、汚泥レスシステムでもリンの除去・回収できる技術開発は水環境の保全、資源回収という観点から非常に重要な課題である。

このように、溶存メタンや N₂O の分解は地球温暖化防止の観点から、また資源回収の観点からリンの回収は重要である。我々はこれらの課題解決のためには、微生物保持能力が高く、エアレーションなしに酸素供給能に優れている好気性 DHS リアクターが処理装置として適しているのではないかと着目している。DHS リアクターは一種の散水ろ床法であるが、微生物保持担体にスポンジが使用され、これにより高濃度微生物保持が可能である。スポンジ担体は水中に浸漬されておらず、空気中に吊されているため、空気中の酸素が排水に溶け込み、また排水はスポンジ内部に重力でしみ込むため、酸素の微生物への供給は拡散ではなく移流によって運ばれ、スポンジ内部に生息している微生物も十分酸素にありつける。この DHS リアクターはインドや国内で下水処理の実証段階にあり、処理性能の素晴らしさは公表されている。

そこで、広島大学では DHS リアクターを利用し、①嫌気性処理水に溶存しているメタンの酸化分解、②亜酸化窒素 (N₂O) の分解、③処理水中からのリン回収、の3つの研究開発を行う。これら研究課題は、今までにない新規性があり、また産業技術に欠かせない重要な環境保全テーマである。

2. 4. 2 嫌気性処理水に溶存しているメタンの酸化分解

2. 4. 2. 1 研究概要

メタンは地球温暖化に及ぼす影響が CO₂ に次いで 2 番目に大きいとされている温室

効果ガスの1つであり、その排出削減は非常に重要な課題である。人間活動に由来するメタン放出源の1つとして廃水・廃棄物の処理がある。特に埋立地から放出されるメタンは、地球上の全メタン放出量の6.7%を占める¹⁾ほど多量であることから、その回収利用や微生物分解による放出防止技術等が盛んに研究されている。嫌気性廃水処理は消費エネルギーが少ない、メタンガスを回収できる等、近年ではCO₂排出量削減の観点からも注目され、その開発が進められている。しかしながら、これら嫌気性処理プロセスから排出される浸出水もしくは処理水などに含まれる“溶存メタン”に関してはあまり注目されていないのが現状である。UASBリアクター等の嫌気性処理水中のメタン濃度は生成バイオガスのメタン分圧に依存するが、約1 mol・m⁻³であり、この溶存メタンが処理水の放流とともに大気に放散されている。メタンはCO₂の25倍もの温室効果ガスであり、微量でも地球温暖化の原因となっている。溶存メタンの揮散はこれまで無視されてきているが、実はかなりの量である。活性汚泥法はエネルギー消費型のプロセスではあるが、ここから排出されるCO₂量は0.28kgCO₂・m⁻³である。一方、溶存メタンの揮散量をCO₂に換算すると0.37kg CO₂・m⁻³であり、嫌気性処理技術は環境にやさしいとは決して言えない。嫌気性処理の特長を生かすには、溶存メタンの大気への放散を防止する技術を開発することが必要不可欠である。

2. 4. 2. 2 研究目的および目標

嫌気性廃水処理は消費エネルギー量が少なくバイオガスとしてエネルギー回収ができるなど、地球環境の観点からも注目され、その開発が進められている。しかしながら、上述のように嫌気性処理水中に含まれる溶存メタンからはかなりの量のメタンが大気中に放散しており、このまま放っておいては地球環境にやさしい技術とは言い難いのが現状である。そこで本研究では、溶存メタンを分解除去することにより、排水処理プロセスから排出される温室効果ガスを削減する。

このような溶存メタンの処理を目的とした処理プロセス・リアクターは、我々の知る限り1例²⁾のみであり、溶存メタン処理に関する基礎的な知見は非常に不足している。そこで、まずは密閉型DHSリアクターにより溶存メタンが大気に放散されることなく、DHSリアクター内で微生物酸化される事を実証することを本プロジェクトの中間目標に掲げた。そして、溶存メタン処理の基礎的な知見を得る目的で、嫌気性処理水を模擬した人工排水を作成し溶存メタンの処理実験を行った。

2. 4. 2. 3 研究内容

実験には直径7 cm、高さ110 cmの円筒形の密閉カラム内に2 cm角のポリウレタン製のスポンジ担体をリアクター上部よりひもで吊るした密閉型の懸垂型スポンジ担体リアクターを用いた(図1)。植種には活性汚泥を用いた。メタンガスでパージをした無機人工排水をリアクター上部より流下させ、同時にリアクター上部より空気供給を行い、

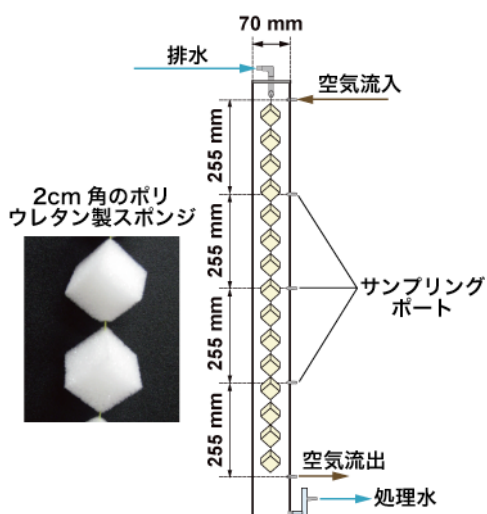


図1 実験に用いた DHS リアクター

排水中に含まれる溶存メタンの酸化分解を行った。リアクターの運転は、phase 1 (day 0 - 60): HRT 2 時間、空気供給量 $0.95 \text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$ 、phase 2 (day 61-128): HRT 2 時間、空気供給量 $2.5 \text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$ 、phase 3 (day 129-204): HRT 1 時間、空気供給量 $2.5 \text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$ 、phase 4 (day 205-): HRT 0.5 時間、空気供給量 $2.5 \text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$ 、の条件で 20°C で行った。

実験の結果、運転開始から 3 週間程度でメタン除去率 97% 以上に到達し、その後、phase 1 では平均して 95 % 以上の高いメタン除去を安定して達成できた (図 2)。空気供給量を増加 (スポンジ体積当りの空気供給量は $10 \text{ m}^3\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$)

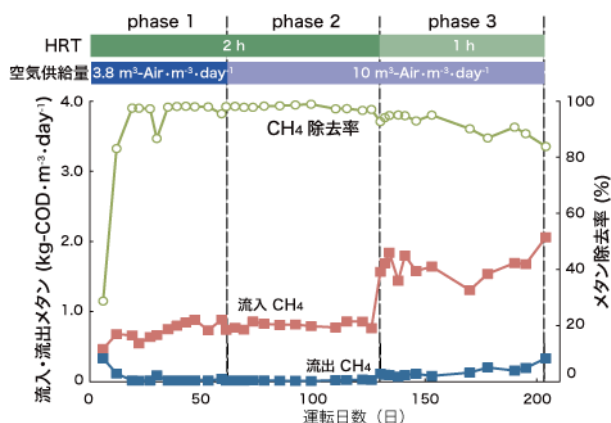


図2 DHS リアクターの運転条件とメタン除去性能

させた phase 2 でも phase 1 とほぼ同等のメタン除去が達成できた。そこで、HRT を短縮し流入メタン負荷を上昇させていったところ、HRT1 時間の phase 3 でメタン除去率約 90% を達成した。現在は、さらに負荷を上昇させ、また空気供給を工夫する事で、より高性能なリアクターをめざし運転を継続している (phase 4)。

Phase 1 ではアンモニア酸化はほとんど進行しなかった。しかし、phase 2 では空気供給量を増加させた直後からアンモニア酸化が進行し、硝酸が生成した。しかしながら、HRT を短縮し負荷を増加させていった phase 3 ではアンモニア除去速度は減少した。これら DHS リアクターにおける硝化とメタン酸化の挙動は、メタン酸化の方が硝化よりも優先して進行する事を示している。アンモニア酸化細菌とメタン酸化細菌

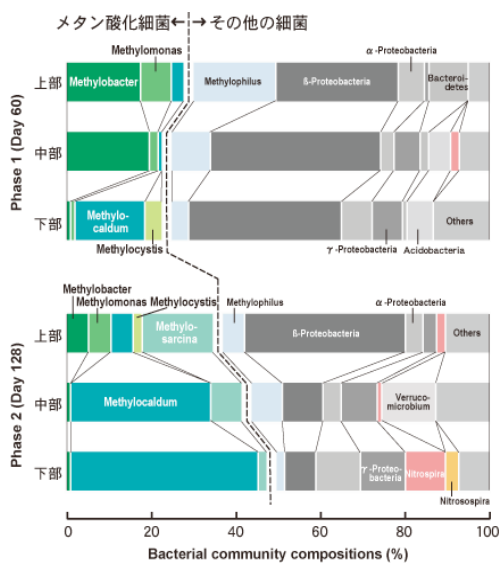


図3 DHSリアクター保持汚泥の16S rRNA遺伝子に基づいたクローン解析結果。細菌を標的としたプライマーセット (EUB338-1492R) を使用。

菌は酸素をめくり競合関係にあり、メタン酸化細菌の方が酸素に対する親和性が高いことから、酸素制限下ではメタン酸化細菌の方が優占するという報告もある³⁾。したがって、本実験でも酸素が硝化とメタン酸化の制限要因の1つであると考えられる。

クローン解析の結果、Phase 1ではリアクターの上部、中部には *Methylobacter*、下部には *Methylocaldum* 属に近縁な細菌が主要なメタン酸化細菌として検出された (図3)。また、リアクター下部では type II のメタン酸化細菌である *Methylocystis* も全クローンに対し 4%ほど検出された。しかしながら、全クローンに占めるメタン酸化細菌の割合はいずれの箇所においても 30%程度であった。一方、メタノール資化性細菌である *Methylophilus* がリアクター上部では特に多く検出された (全クローンの 20%)。このことから、空気供給量の少ない phase 1 においては、メタン酸化の中間代謝物としてメタノールが生成しているのではないかと推察された。 phase 2 ではメタン酸化細菌の割合は増加し、全クローンに対し 40-50 %程度を占めた。また、その構成も変化した上部では *Methylosarcina* の割合が増加した。中部および下部では *Methylocaldum* 属に近縁な細菌が主要なメタン酸化細菌であった。このように、DHS リアクターを用いる事で、メタン濃度に応じた最適なメタン酸化細菌群を維持する事ができたため、非常に効率的にメタン酸化が達成できたと考えられる。

2. 4. 2. 4 研究成果

本研究では密閉型 DHS リアクターを使用し、アンモニアと溶存メタンを含むシンプルな模擬廃水を用いて溶存メタン除去実験を行った。その結果、メタン酸化はリアク

ター運転開始後速やかに立ち上がり、その後安定して進行する事や、メタン酸化はアンモニア酸化よりも酸素に対する親和性が高く、優先して起こる事が分った。また、リアクター内でメタン除去を主に担っているのは γ -Proteobacteria に属する type I のメタン酸化細菌である事がわかった。今後は、実際の嫌気性処理水に含まれているであろう、硫化物や有機物を含んだ排水での処理実験を行い、メタン酸化とこれら物質との酸化反応の競合関係を明らかにし、高いメタン除去率と除去速度を両立しうる運転条件(HRT および空気供給量)を検討していく事が必要である。

これまでの研究で得られた結果を基にして、溶存メタン処理 DHS を導入する事で削減できる温室効果ガス排出量(CO₂ 排出量)を試算すると以下のようなになる。

溶存メタン処理対策を施していない従来型の嫌気性処理(UASB 法; 処理槽高さ 5 m)の場合、ポンプ動力と溶存メタンの大気への放出を合わせると、CO₂ 排出量は 0.304 Kg-CO₂·m⁻³ となる。一方、溶存メタン処理 DHS リアクター(高さ 5 m、溶存メタン除去率 90%)を用いる事で、DHS リアクターに用いるポンプ動力を考慮した上でも、全体の CO₂ 排出量は 0.0461 Kg-CO₂·m⁻³ となり、密閉型 DHS リアクターの導入で CO₂ 排出量は 1/6 以下に削減できる。

2. 4. 3 N₂O ガス分解 DHS リアクターの開発

2. 4. 3. 1 研究概要

亜酸化窒素(N₂O)は CO₂の約 310 倍の温室効果をもち、現在地球温暖化に 6%程度寄与する非常に強い温室効果ガスであり、京都議定書でも削減対象の一つとされている。排水処理施設で窒素除去プロセスとして用いられている生物学的硝化脱窒法からも多量の N₂O が生成しており、その対策が急務とされている。この亜酸化窒素は脱窒し、窒素に還元することで処理を行うことが出来る。脱窒には一般的に有機物が電子供与体として用いられるが、近年メタンを用いた脱窒が注目されている。メタンも生物学的排水処理法によって発生する温室効果ガスであるが、安価な炭素・エネルギー源であり、脱窒に用いる上で優れた点が多い。メタンを用いた脱窒はメカニズムが不明な部分があるが、一般的にはメタン酸化細菌がメタンを酸化する過程で放出する中間代謝物を脱窒菌が利用していると考えられている。好気的環境下でのメタン脱窒は以前から知られていたが、近年メタンを用いた嫌気的環境下での硝酸・亜硝酸の脱窒を行う微生物の報告がされた⁴⁾。嫌気的なメタン脱窒の場合、酸素供給のための曝気が不要であり、エネルギーコストを抑えることが出来る。また曝気による亜酸化窒素、メタンの大気中への放散も防ぐことが出来る。よって、この微生物を利用すれば亜酸化窒素とメタンの効率的同時処理が出来るのではないかと考えられる。

上述のように生物学的に N₂O は脱窒反応の過程により N₂に還元することができるが、有機物の継続的な添加が必要である。N₂O を生物学的に酸化することができれば有機物は不要となり N₂O を除去する上で大幅なコスト削減になるが、そのような反応の報

告例はない。 N_2O が NO_2^- もしくは NO_3^- に酸化する反応を考えると、自由エネルギー変化量はマイナスであり熱力学上生物学的酸化反応は進行可能であると思われる事から、これらの反応を利用してエネルギーを獲得する何らかの微生物が存在している可能性がある。

そこで、本研究では N_2O の生物学的除去を目指し、新規密閉型 DHS リアクターを用いた N_2O 除去プロセスの構築を目指した。

2. 4. 3. 2 研究目的および目標

窒素除去プロセスから発生する N_2O ガスは非常に強力な温室効果ガスであり、近年特に問題となっている。特に、最近 anammox 反応を利用した窒素除去プロセスの研究が盛んであり、我が国にも実処理装置が 1 基稼働している。このプロセスではアンモニアを亜硝酸イオンまでで酸化を止める部分硝化が必要であり、この反応は低酸素で行うことができる。また部分硝化と anammox 反応を一槽のリアクターで窒素除去することも可能である。したがって、anammox 反応を利用した脱窒処理は、通常の硝化・脱窒プロセスと比較して、消費エネルギー、汚泥排出量の大幅削減が期待できる次世代型プロセスと目されている。しかしながら、この anammox プロセスでは窒素の一部は N_2O にガス化して大気に放出されている。申請者らの実験および Kampschreur らの報告⁵⁾によるとアンモニア性窒素の 5~10%が N_2O としてガス化している。この量は非常に多量であり、 N_2O の問題を解決しない限り anammox プロセスは環境にやさしいプロセスとはなり得ないのではないかと考えられる。

そこで本研究では、 N_2O ガスを脱窒あるいは酸化処理する事で排水処理プロセスから排出される温室効果ガスを削減する。この N_2O ガスの処理には脱窒あるいは酸化処理が考えられる。特に N_2O ガスの酸化分解は今までにその報告が無い事から、まずは人工排水およびガスを用い DHS リアクター内で酸化分解、亜硝酸イオンあるいは硝酸イオンへの転換の確認、を本プロジェクトの中間目標に掲げた。一方の、脱窒処理に関しては有機物の添加による N_2O の脱窒は通常の反応であるため、本研究では特にメタンを用いた嫌氣的 N_2O ガスの還元処理を最終目標とし、中間目標では人工排水およびガスを用いて、DHS リアクター内での N_2O ガスの分解の確認を目標とした。

2. 4. 3. 3 研究内容

好気条件下での回分培養実験は、複数の下水処理場の活性汚泥を植種源としてそれぞれ用いて 124ml のバイアル瓶で行った。無機塩培地に N_2O を入れ、好気状態を保ち 25°C 、170rpm で振とう培養を行った。培養前、培養中、培養後にガスクロマトグラフによりバイアル瓶中の気体濃度を測定し、 N_2O が減少しなければ pH などの条件を変え、実験を繰り返した。また、イオンクロマトグラフにより培養前後にイオン態窒素濃度を測定し、窒素量の物質収支を測定した。さらに N_2O が減少した培養系では、液量

の 1/2~1/4 を継代培養に用いて、 N_2O 酸化分解微生物の集積を試みた。

回分培養の結果、初期微生物濃度を高めに設定した培養系では N_2O の減少が確認できたが、酸化分解時に発生すると考えられる硝酸・亜硝酸があまり蓄積せず窒素収支が合わない、また N_2O 減少が途中で止まってしまう等の現象が観察された(図4)。ただし、水銀を添加し微生物の生育を阻害した培養系ではこのような現象は確認されなかった。この事から、 NO 等の中間代謝物が蓄積している可能性が考えられた。連続培養実験は高さ 60 cm のベンチスケール DHS リアクターを用いて、溶存 N_2O を流入し実験を開始した。連続培養実験でも回分培養と同様に N_2O の

減少が微量ながら確認された。しかしながら、リアクターを立ち上げて間もない事もあり、結論を下すには至っておらず今後も実験を継続する。

嫌気条件下での回分培養実験は、容積 720mL のバイアル瓶を用い、植種源として水田土壌を使用した。液体培地には嫌気性無機人工培地を用い、気相部を純メタンで満たし、スポンジ担体を使用した系と使用しない系を作成し、30°Cで攪拌および静置培養を行った。培養の結果、硝酸の脱窒に伴ってバイアル内のメタンの減少が確認できた。培養は無酸素条件下で有機物を添加せずに行ったことから、メタン及び硝酸の減少は嫌気的メタン酸化と脱窒によるものであると考えられる。またメタン減少量と硝酸減少量の比についても、全ての培養系で嫌気的メタン脱窒の理論値($CH_4 : NO_3 = 5 : 8$)に近い値をとった。しかし培養初期の約 1 ヶ月間の硝酸の減少速度が、それ以降の硝酸減少速度に比べ速いことから、植種に用いた水田土壌中に存在していた有機物が、硝酸の脱窒に関与しているのではないかと考えられる。このことから、実際にメタンを用いて行われた硝酸の脱窒量は測定値よりも若干小さくとなると考えられる。

連続培養ではラボスケール DHS リアクター(図5)を用い、基質として嫌気性無機人工排水に硝酸ナトリウム 1mM 添加し、 N_2O とメタンを溶存させたものを流量比 9:1 となるようポンプで送り込みリアクター上部から流入させた。運転の結果、各溶存ガスは培養 30 日目には減少が確認された(図8)。また硝酸についても 0.1~0.2 mmol·L⁻¹ の減少が確認できた(図6)。しかし Phase 1 では溶存亜酸化窒素減少量に対し、溶存メタン減少量が大きかった。これは添加した硝酸の減少量を考慮した場合でも約 1.8 倍程度多くメタンが減少し

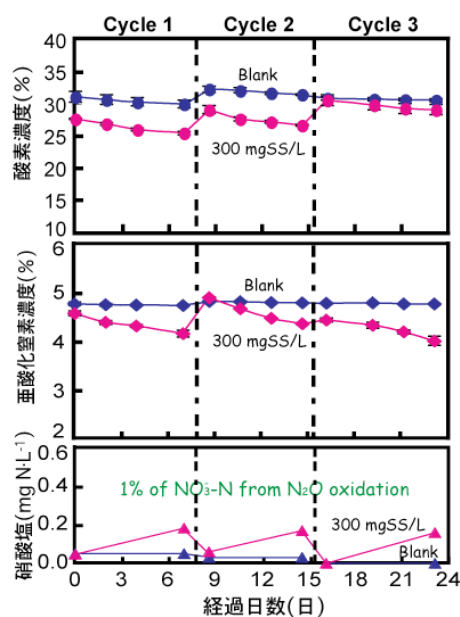


図4 好氣的条件下で亜酸化窒素分解微生物の集積培養実験の結果

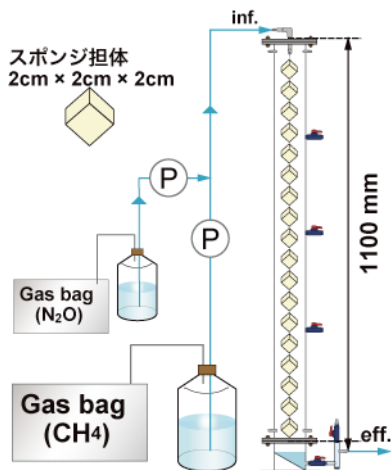


図5 メタンを用いた亜酸化窒素除去実験に用いた DHS リアクターの概略。DHS リアクターは直径 68 mm の円筒形カラムで、その内部にスポンジ担体を吊るしている。

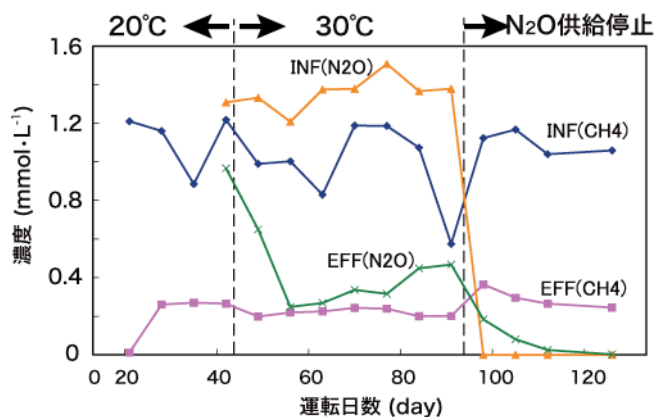


図6 DHS リアクターを用いた亜酸化窒素ガス分解実験の結果。実験は温度条件およびガスの供給条件を変更して行い、メタンをもちいた亜酸化窒素の脱窒性能を調査した。

ている。そこで Phase 2 として溶存亜酸化窒素の流入を停止して運転を行い溶存メタン濃度の変化を観察した。その結果溶存メタンは溶存亜酸化窒素の有無に関わらず大幅に減少していることが確認された。この原因として本実験で用いたリアクターは、スポンジ担体の充填率が約 5 % と低く、気相部が全スポンジ容積に対し非常に大きいため、気相部と流入基質においてガス濃度が平衡に達しておらず、溶存ガスが気相部に放散していると考えられた。そのため流入基質から想定される気相部の平衡時の濃度の亜酸化窒素・メタン混合ガスを作成、充填させて運転を再開し亜酸化窒素とメタンの反応比についての調査を行い、これを Phase 3 とした。Phase 3 では流出の溶存、及びリアクター気相部の亜酸化窒素・メタン濃度の減少が確認された。量論的に安定した結果はいまだ見られていないが、嫌氣的なメタンと亜酸化窒素の処理がなされることを確認した。この嫌氣的なメタンと亜酸化窒素の減少は、植菌を行わないスポンジを用いた、同様のリアクターによるブランク試験との比較結果から、減少量のすべてが微生物分解とはいかないまでも、大部分が微生物作用によるものであると確認ができた。

2. 4. 3. 4 研究成果

嫌氣的 N₂O 処理実験では、バッチ培養実験と DHS リアクターを用いた連続培養実験の二つの実験を行った。いずれの実験においても嫌気メタン脱窒が行われていると考えられる測定結果を得ることができた。また DHS リアクターを用いた連続培養実験では、亜酸化窒素を嫌気メタン脱窒によって除去することが可能であることを確認することが出来た。

好氣的 N₂O 処理実験でも嫌氣的処理実験と同様にバッチ培養実験と DHS リアクターを用いた連続培養実験の二つの実験を行った。その結果、対照実験の結果から生物学的な作用による N₂O の減少が確認できたが、N₂O の減少量に相当する硝酸・亜硝酸

イオンの生成が確認できなかった。したがって、 N_2O は酸化分解の途中まで進行して停止している可能性が考えられた。

好気条件および嫌気条件のいずれの条件でも微生物の増殖が非常に遅かった。そのため微生物解析用に十分なサンプル得る事ができず、どのような微生物が N_2O の酸化もしくは脱窒に関与しているのか特定する事はできなかった。今後、微生物が十分増殖した後分子生物学的な手法を用いて、 N_2O の酸化もしくは脱窒に関与している微生物の特定を行い、その情報を基に更なる最適な DHS リアクターの運転条件の検討を行う。その条件のもと実際の排水処理プロセスから排出される排水および N_2O ガスを用いて処理実験を行い、DHS リアクターの性能評価を行う。

これまでの研究で得られた結果を基にして、 N_2O 処理 DHS を導入する事で削減できる温室効果ガス排出量 (CO_2 排出量) を試算すると以下のようなになる。

従来の硝化脱窒もしくは Anammox プロセスからは窒素除去の 0.5-6.7%が N_2O になっていると報告されている⁵⁾。この N_2O 放出量は CO_2 換算で $0.0598 \cdot 1.23 \text{ Kg} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-3}$ である。一方、この従来型のプロセスに、高さ 5 m の DHS リアクターを増設し発生する N_2O の 90%を除去したとすると、プロセス全体の CO_2 排出量は DHS リアクターに用いるポンプの動力を加味しても、 $0.0142 \cdot 0.131 \text{ Kg} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-3}$ となる。したがって、本プロジェクトで開発を行っている N_2O 除去 DHS リアクターを付加する事で CO_2 排出量は従来比 $1/4 \sim 1/9$ に削減できる。

2. 4. 4 リン除去・回収 DHS リアクターの開発

2. 4. 4. 1 研究概要

リンは水域の富栄養化の原因物質の1つであり、我が国においては閉鎖性海域の水質改善を目的に、第5次水質総量規制より規制対象物質として規制の対象となり、適切な負荷削減対策の実施が求められている。下水中からのリン除去法としては物理化学的方法と生物学的リン除去法がある。このうち、物理化学的方法の代表的な手法である晶析脱リン法は、下水の前処理やリン除去に用いる薬剤のコスト等問題から日本ではほとんど普及していない。一方の生物学的リン除去法は、嫌気条件下においてリンを吐き出し、その後の好気条件下において吐き出した以上のリンを摂取する、という性質をもつポリリン酸蓄積細菌の作用を利用したものである。その運転方法は嫌気条件と好気条件を繰り返すように汚泥の返送を行うものであり、リンを高濃度に蓄積した微生物(汚泥)を引き抜く事で、水系よりリンを除去する。したがって、生物学的リン除去プロセスは必然的に余剰汚泥を発生させるシステムである。

リンは富栄養化を引き起こす厄介者というだけではなく、現代社会にとって必須な資源でもある。リンは将来的に枯渇する事が確実視されている事から、リンを100%輸入に頼っている我が国においては、リン資源の回収・再利用が緊急の課題となっている。そこで、下水中に含まれるリンが資源として注目を浴び、資源として回収しようという

研究が盛んに行われている。ところが、生物学的リン除去プロセスは汚泥を作る手法であり、その処分に費用がかかる。またもう一方の晶析法でも薬剤コストの問題がある。したがって、現状においてはいずれの手法を用いてもコスト高の問題からリンを資源として回収しても採算が合わないのが現状である。

排水処理においては汚泥の処分コストが最も厄介な問題であるため、余剰汚泥の排出が少ない処理プロセスが求められており、様々な余剰汚泥削減プロセスが研究・開発されている。したがって、富栄養化対策および資源回収の観点から、余剰汚泥レスのプロセスからの低コストリン回収プロセスの創出が求められている。そこで、本研究では余剰汚泥の引き抜きに依存しない、新規な生物学的リン回収システムの開発を目的とした。

2. 4. 4. 2 研究目的および目標

従来の生物学的リン除去プロセスでは嫌気と好気条件を繰り返すことでポリリン酸蓄積細菌にリンを取り込ませ、その汚泥を回収することでリン除去が行われる。したがって、余剰汚泥の発生しない水処理プロセスは非常に好ましい方式であるが、このような方式では、従来型のリン除去法は適用で来ない。またリン除去プロセスを持たない処理施設も多くあり、これらの処理水からリンを除去し回収することは緊急の課題である。

我々のこれまでの研究の結果から、DHS リアクターによる下水処理においてメカニズムの解明は不十分であるものの、余剰汚泥レスが達成されていることを確認している。我々は、DHS リアクターの様な汚泥レスプロセスからも余剰汚泥を発生させることなく、リンを資源として回収するプロセスができないかと考え研究を行ってきた。その結果、密閉型 DHS に空気送風量を制御して嫌気・好気を繰り返すことで、リン蓄積細菌をスポンジ内に特異的に生息させる。好気時にはリン除去未処理水中のリンをリン蓄積細菌に摂取・蓄積させ、嫌気時に下水などの有機物源を供給すれば、蓄積したリンが放出されて高濃度のリン含有水が得られるため、余剰汚泥を経由せず直接にリン回収を行うことができる。という手法を考案した。ただし、高濃度の液としてリン回収は原理的に可能であるが、実用化のための知見が非常に乏しいのが現状であった。

そこで、本研究プロジェクトでは密閉型 DHS を用いたリン回収を最適化するため、まずはより運転管理の簡単なチューブリアクターを用いて、回収リン濃度を流入リン濃度の 10 倍以上に濃縮された液として回収することを中間目標として掲げ研究を開始し、さらに回収リン濃度をより高度化する運転手法の開発を目指した。

2. 4. 4. 3 研究内容

まず、密閉型 DHS と同様な Plugflow 型リアクターでのリン回収の可能性とそれに適した時間条件を検討する為にビニルチューブを使用した Plugflow リアクターを運転した。使用したチューブは長さ 3 m、内径 5 mm (容積 0.06 L)、植種源は活性汚泥を用い、HRT 10 分で運転した。嫌気・好気時間の比を 1 : 2、1 : 3、1 : 5 とし、嫌気

好気の 1 サイクル時間を 6 ～ 24 時間の間で設定したリアクターを運転し、リン摂取・放出能を評価した。その結果、最も良好なリン摂取・放出は 12 時間サイクルにおいて見られた。また、24 時間サイクルではリンの摂取・放出共にほとんど見られず、嫌気時に有機物を摂取していなかった事からサイクル時間が長すぎると悪影響が生じることが示唆された。一方、有機物の摂取は 18 時間サイクルが最も良かった。そこで、このチューブリアクターで見いだされた嫌気・好気時間のサイクル（嫌気 4 時間、好気 8 時間）を使用し、ベンチスケール DHS リアクターを作成しリン回収実験を行った。また、この運転の際には嫌気時のリン含有水を循環して使用する事で、回収リン濃度を飛躍的に高濃度化できる新たな運転方法（H 2 1 年 2 月 特許出願、特願 2009-044797）を考案し、その実証も行った。

その結果、運転日数の経過と共に回収リン濃度が上昇する事が確認できた（図 7）。その後、流入する有機性排水量と回収液量を半分にし、同時に有機性排水の濃度を 2 倍の 6000 mgCOD・L⁻¹ に変更した。その結果、徐々にリン濃度は高くなり 158 mgP・

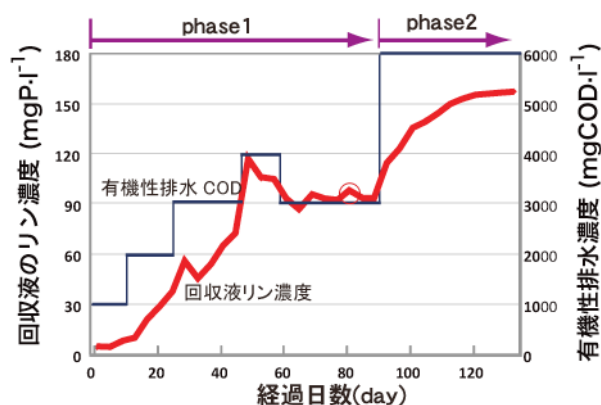


図 7 DHS リアクターを用いたリン高濃度化の結果

L⁻¹ (好気流入リン濃度の 31.6 倍) に達した。この濃度は MAP 法等のリン回収法に適用可能な濃度である。リアクター内のリン収支を調べた結果、リンを高濃度化して回収できているものの、リンの回収率は 20-30% と比較的低いものであった。そこで、どのような原因でリン回収率が低下しているのかを詳しく調査した結果、回収リン濃度とリン回収率はトレードオフの関係にあるという事が判明した。

スポンジ担体より汚泥を採取して微生物叢を FISH 法により解析したところ、スポンジ表面部では全細菌に対する PAOs の割合は 58% を占めており、本装置は高濃度に PAOs を保持できることが分かった（図 8）。さらに、汚泥中の微生物を 16S rRNA 遺伝に基づいてクローン解析を行ったところ、スポンジ表面部では PAOs が属する *Rhodocyclus* 属に近縁な種が多数検出された（図 9）。また、汚泥のリン含有量を調べたところ、リン含有量は嫌気終了時と好気終了時で 7.01 mgP・gVSS⁻¹ 差が生じていた。これらの事から、DHS リアクターを用いる事でリン蓄積細菌を優占的に高濃度に保持する事が可能となり、このような高性能リン回収リアクターが構築できたものと考えられる。

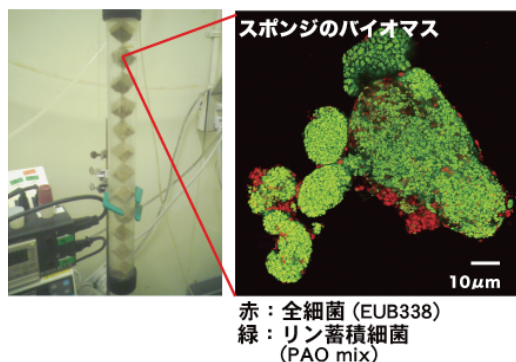


図8 ベンチスケールリン回収 DHS リアクター (左) と DHS リアクターより採取した汚泥を用い、リン蓄積細菌を標的とする PAOmix プローブで FISH を行った結果 (右)

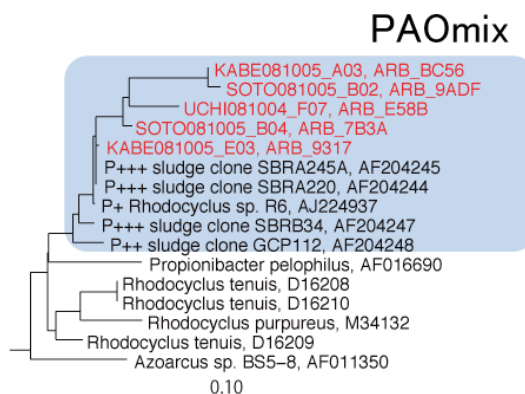


図9 ベンチスケールリン回収 DHS リアクターより採取した汚泥を細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としてクローン解析を行った結果。赤字は本研究で得られたクローン配列で、系統解析の結果、*Rhodocyclus* 属に属したものを示している。

2. 4. 4. 4 研究成果

プラグフロー型リアクターにより、リン蓄積細菌にとって最適な嫌気・好気時間を検討し、最も良好なリン摂取・放出は 12 時間サイクルであることを見いだした。そして、DHS リアクターにその 12 時間サイクルを適用し、さらに、新規に考案し特許出願を行った運転方法によって、低濃度リン含有水 ($5 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$) を $158 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$ (31.6 倍) に濃縮し、回収する事が出来た。DHS スポンジ担体の微生物叢を FISH 法および 16S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析、分子系統解析で分析を行ったところ、スポンジ表面部ではリン蓄積細菌 (PAOs) の構成比は 58% という高い優占率であった。この事から DHS リアクターを用いる事で PAOs を優占的に高濃度に保持する事が可能となり、このような高性能リン回収リアクターが構築できたものと考えられる。しかしながら、リン回収率が低いという問題が存在しており、今後はリンの回収率向上を目指した運転方法の開発が必要となってくる。

これまでの研究で得られた結果を基に、リン回収 DHS を既存のリン除去施設を持たない下水処理施設に導入する事で削減できるリン回収コストを試算すると以下のようになる。

余剰汚泥を発生させない下水処理プロセスに、従来型のリン除去回収プロセスを付加する場合、下水中のリン濃度は $5 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$ と低い事から、一般的に晶析法 (HAP 法) が適用される。その場合のリン除去・回収コストは排水 1 m^3 当たり 37.3 円である⁶⁾。一方、DHS リアクターによるリン除去回収プロセスの場合、DHS によりリン濃度を 20 倍に濃縮してから MAP 法によるリン回収を行う。そのため、MAP 法を行う処理水量は元の $1/20$ となる。したがってリン回収コストは、 $23.1 \text{ 円} \cdot \text{m}^{-3}$ (MAP 法のコスト) $\times 1/20 = 1.2 \text{ 円} \cdot \text{m}^{-3}$ となる。これに、DHS の電気代 $2 \text{ 円} \cdot \text{m}^{-3}$ を追加し、嫌気処理時に使用する酸発酵液の費用を考慮に入れても、DHS リア

クターを用いてリン回収を行う事で、従来型のリン除去回収プロセスと比較して、リン回収コストを1/3以下に削減する事が可能となる。

2. 4. 5 研究体制

委託先名	国立大学法人 広島大学大学院 工学研究科		
業務管理者	広島大学大学院工学研究科・研究科長 吉田 総仁 電話：082-424-7500 FAX：082-422-7039 E-mail： kou-bucho-soumu@office.hiroshima-u.ac.jp		
経理責任者	広島大学大学院工学研究科部局長支援グループ 主査（研究協力担当）草田 憲一 電話：082-424-7517 FAX：082-424-5461 E-mail： kou-bucho-zaimu@office.hiroshima-u.ac.jp		
研究実施場所 及び 登録研究員	国立大学法人広島大学大学院工学研究科 社会環境システム専攻 環境保全工学研究室 〒739-8527 広島県東広島市鏡山1丁目4番1号		
	氏名	所属・役職	主な担当事業内容
	大橋晶良	大学院工学研究科社会環境システム専攻・教授	溶存メタン分解およびリン回収 DHS の開発
	金田一智規	大学院工学研究科社会環境システム専攻・助教	亜酸化窒素除去システムの開発
	幡本将史	ポスト・ドクトラル	リン除去 DHS の開発 メタン酸化 DHS の開発
	CHUANGHUI -PING	ポスト・ドクトラル	亜酸化窒素除去システムの開発

2. 5. 6 参考文献

- (1) Lelieveld, J.; Crutzen, P. J.; Dentener, F. J. *Tellus* 1998, 50, 128-150.
- (2) 福永栄、永井清、河野哲郎.第31回下水道研究発表会講演集 1994、851-853.
- (3) Megnaw, S. R.; Knowles, R. *Biology and Fertility of Soils* 1987, 4, 205-212.
- (4) Raghoebarsing, A. A.; Pol, A.; van de Pas-Schoonen, K. T.; Smolders, A. J. P.; Ettwig, K. F.; Rijpstra, W. I. C.; Schouten, S.; Damste, J. S. S.; Op den Camp, H. J. M.; Jetten, M. S. M.; Strous, M. *Nature* 2006, 440, 918-921.
- (5) Kampschreur, M. J.; Temmink, H.; Kleerebezem, R.; Jetten, M. S. M.; Loosdrecht, C. M. v. M. *Water Research* 2009, In Press.
- (6) 加藤文隆、大下和徹、高岡昌輝、武田信生、松本忠生、檜物良一. 土木学会論文集 G、2006、27-40.

2. 5 嫌気性アンモニア酸化(ANAMMOX)プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発

(委託先：北海道大学工学研究科)

2. 5. 1 Anammoxプロセスの最適条件の検討

嫌気性アンモニア酸化 (anammox) プロセスは、嫌気条件下でアンモニアと亜硝酸から直接窒素ガスに変換する生物反応である。anammox プロセスは、従来の窒素除去プロセスである硝化脱窒法と比較して、酸素及び有機物の供給が不要、さらにこれらを供給するための電力、薬品、また有機物から発生する余剰汚泥量の低減などの特長を有しており、大幅なランニングコストの削減が期待されている。しかし、anammox 細菌は難培養性の絶対嫌気性細菌であり、増殖速度が極めて遅く集積培養が非常に困難であるため、anammox 細菌の生理・生態に関する知見は極めて少ない。

これまでに著者らは、real-time PCR 法を用いた anammox 細菌の迅速な定量方法・検出方法を開発し、植種汚泥として最も適した汚泥を選択することを可能とした¹⁾。さらに、選択した適切な汚泥を不織布を生物膜担体とした上向流カラムリアクターに植種し連続運転を行うことにより、anammox 細菌の効率的な集積培養に成功した²⁾。上向流カラムリアクター全体として、高い窒素除去速度は達成できたが、リアクター後半部では anammox 細菌が十分に存在するにもかかわらず、anammox 反応がほとんど生じていないことが明らかになった³⁾。この理由として、anammox 細菌は pH の上昇により活性阻害を受ける可能性があることが指摘されていることより、著者らのリアクターにおいても、リアクター後半部に存在する anammox 細菌は pH の上昇により阻害を受けた可能性が考えられる。

そこで本研究では、anammox リアクター内に廃水の流れ方向に棲み分けする微生物群集構造(空間的配置)や活性をモニタリングし、リアクターを最適化することを目的とした。具体的には、リアクターへの基質流入方式を二段ステップ流入方式に切り替え、HRT を短縮することにより、リアクター後半部における pH 上昇の抑制を試みた。リアクター後半部における pH の上昇を抑制し、リアクター後半部における anammox 活性を高く維持することにより、リアクター全体としての処理能力の向上を図ることを目的とした。

2. 5. 1. 1 Anammoxリアクターの処理効率の評価

本研究では、植種汚泥として本研究室で運転を行っている上向流型anammoxリアクター内のバイオマスを使用し、図1に示すようにポリエステル製の不織布を生物膜担体として充填した内径26 mm、全長280 mm、容積150 mLのガラス製カラム型リアクターに人工無機培地を上向流にて連続供給した。約300日間運転を行い、anammox細菌の馴養を行った後、実験を開始した。本研究におけるanammoxリアクターの運転条件及び人工無機培地の構成を表 1に示す。本研究では、Phase 3、4、5、6において、基質流入管をリアクター中間部に挿入 (図 1) することにより、リアクター前半部の流入口より流入する基質と同濃度、同流量の基質を二段ステップ

方式で流入させ運転を行った。また、リアクター各部位での処理水を採取し、リアクターの各区分 (Zone A-Zone D) での処理性を評価した。anammox反応による窒素ガス生成時に生物膜担体からバイオマスが剥離することを最小限に抑制する目的でリアクターを45度斜めに設置した。NH₄⁺-N 及びNO₂⁻-N濃度はNH₄⁺-N : NO₂⁻-N = 1.2 : 1、KHCO₃濃度は500 mg/L、流入水 pHは7.2±0.1 (塩酸により調整)、培養温度は37°Cに設定した。さらに、流出NO₂⁻-N濃度が50 mg/L、pHは流出水のpHが最適pHの上限である8.3以下になるようにそれぞれ調整した。また、培地作成時に窒素ガスで曝気し、溶存酸素 (DO) をDO計 (DO-5Z, KRK) で測定することにより0.1 mg/L以下にし、ヘッドスペースへ窒素ガスを約5分間置換することで培地を無酸素状態に保った。また、水理的滞留時間 (HRT) を0.1-1.6 hに設定した。リアクターの流入部及び流出部にはテフロン目皿を設置し、培地の容器にはガラス製で茶褐色細口共栓試薬瓶 (容積 11 L、23 L) を使い、気体の不透過性に優れているバイトン栓により蓋をした。さらに、窒素ガスを充填したアルミニウムバックを設置することで、培地が減少することにより生じるヘッドスペースへの酸素の混入を防いだ。チューブには気体の不透過性に優れているファーマドチューブ (PharMed BPT Tubing, MASTERFLEX, Illinois U.S.A) を使用し、培地交換時に毎回超音波洗浄を行った。

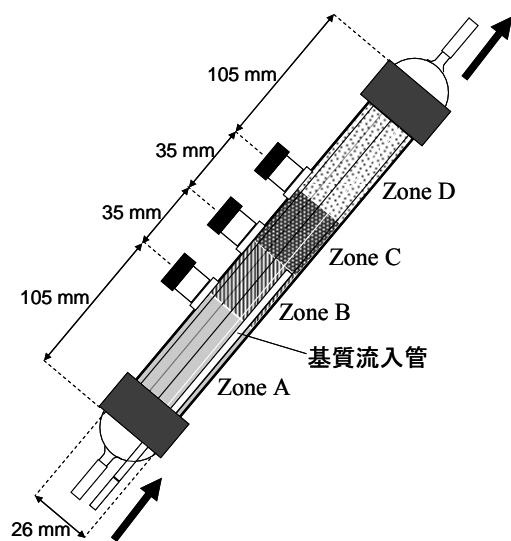


図 1 本研究で用いたガラス製カラム型リアクター

表 1 anammox リアクターの運転条件

	運転期間 (day)	HRT (h)
Phase 1	35	0.8
Phase 2	9	1.6
Phase 3	40	前半部; 1.6 後半部; 0.8 (ステップ流入)
Phase 4	15	前半部; 0.8 後半部; 0.4 (ステップ流入)
Phase 5	9	前半部; 0.4 後半部; 0.2 (ステップ流入)
Phase 6	16	前半部; 0.2 後半部; 0.1 (ステップ流入)
無機合成培地	[mg/L]	
(NH ₄) ₂ SO ₄	140-420	
NaNO ₂	120-410	
KHCO ₃	500	
KH ₂ PO ₄	27	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	180	
微量金属元素 (TES I, TES II)		
培養温度	37°C	
DO	0.1 mg/L以下	
流入pH	7.2±0.1	
リアクター容積	150 mL	

TES(Trace Element Solution) I

EDTA	15 [g/L]
FeSO ₄ ·7H ₂ O	9.14

TES(Trace Element Solution) II

EDTA	15 [g/L]
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.43
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.24
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.99
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O	0.22
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.19
Na ₂ SeO ₄ ·10H ₂ O	0.21
H ₃ BO ₃	0.0014

上向流カラムリアクターの処理性を評価するために、サンプルを 0.2 μm のメンブレンフィルター (DISMIC-13CP, ADVANTEC) で濾過後、イオンクロマトグラフ (DIONEX D-100、陽イオンカラム : IonPac CS3, DIONEX、陰イオンカラム : IonPac AS9-HC, DIONEX) を用いてリアクターの培地及び流出水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 及び $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 濃度を測定した。また、pH 計 (B-212, HORIBA) を用いてサンプルの pH を測定した。

(1) ステップ流入運転前における処理性

各Phaseにおける流入水中の平均 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度、及びHRTを図 2に、また、流入窒素負荷、窒素除去速度、及びHRTの経日変化、ならびに各Phaseにおけるリアクター各区分での平均窒素除去速度及び窒素除去に対する寄与率を図3に示す。さらに、流入水中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及び $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度は、anammox活性が良好な $\text{NH}_4^+\text{-N} : \text{NO}_2^-\text{-N} = 1.2 : 1$ になるように設定した。また、各Phaseにおける流入水中の基質濃度は、基質の枯渇を防ぐ目的で、流出水中の $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度が50 mg/L付近になるように計算して決定した。Phase 1においてHRTを0.8 hに固定し運転を行ったところ、窒素除去速度は安定的に推移し、平均窒素除去速度は $10.2 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ (平均窒素負荷; $17.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) であり、各区分における窒素除去への寄与率はそれぞれ73% (Zone A)、10% (Zone B)、3% (Zone C)、14% (Zone D) であった。これはリアクター体積比の38%に相当するZone Aにおいて7割以上の窒素が除去され、それ以降の部分では、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及び $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度が十分であったにも関わらずリアクターのパフォーマンスが著しく低下していることを示している。HRTを1.6 hに延長し流入窒素負荷を低下させたPhase 2では、平均窒素除去速度は $6.7 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ (平均窒素負荷; $10.3 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) とPhase 1に比べて減少した。

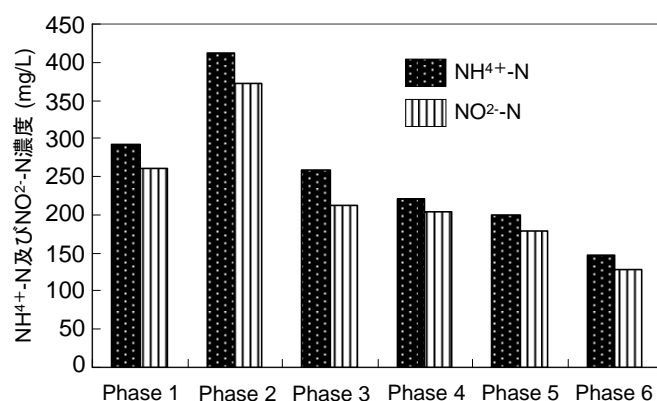


図 2 各Phaseにおける流入水中の平均 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃

(2) ステップ流入運転後における処理性

リアクターの運転開始 44 日目に、リアクターを二段ステップ流入方式に切り替え運転を行った。Phase 3 (前半部 HRT; 1.6 h、後半部 HRT; 0.8 h) でステップ流入方式導入後、HRT を段階的に短縮していった。その結果、Phase 5 (前半部 HRT; 0.4 h、後半部 HRT; 0.2 h) では、リアクター後半部の anammox 活性が上昇し、それに伴いリアクター全体の平均窒素除去速度が $26.8 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ まで増加した(図 3)。また、Phase 5 においては、リアクター後半部 (Zone C + Zone D) はリアクター全体の窒素除去の 5 割以上に寄与していた。さらに HRT を短縮し窒素負荷を増加した Phase 6 において、窒素除去速度が最大の $31.2 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ を記録した。しかしながら、運転を継続するに伴い流出水中の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の上昇が確認され、窒素除去速度はこれ以上増加せず、リアクター全体の平均窒素除去速度は Phase 5 と同程度 ($26.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) であった。このことより、Phase 6 においてリアクター前半部及び後半部それぞれにおいて窒素除去速度は最大に達したと考えられる。

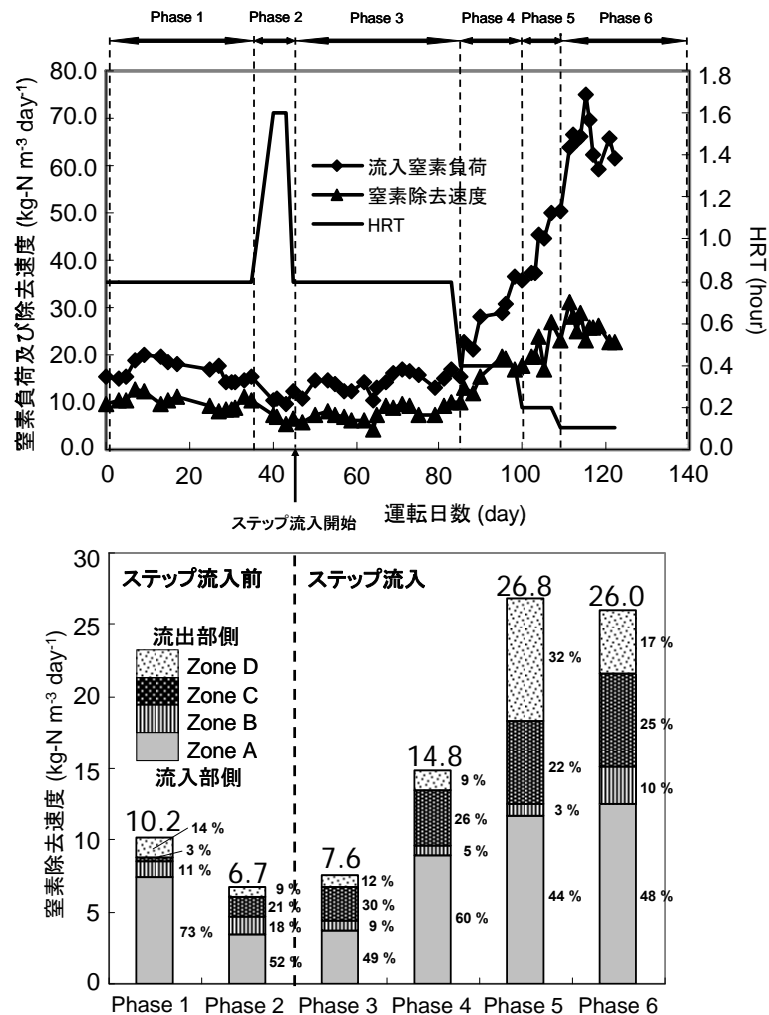


図 3 流入窒素負荷、窒素除去速度、及びHRTの経日変化、ならびに各Phaseにおけるリアクター各区間での平均窒素除去速度及び窒素除去に対する寄与率

(3) 流出水中の pH の変化

流入水のpHを 7.2 ± 0.1 に設定した場合の各Phaseにおける流出水の平均pHを図4に示す。ステップ流入を導入しHRTを段階的に短縮していくことによって、流出水の平均pHは減少していった。Phase 1において流出水の平均pHは8.2であったのに対し、リアクター前半部及び後半部のanammox活性の上昇が停滞したPhase 5以降では、流出水の平均pHは7.9 (Phase 5)、7.7 (Phase 6) に低下していた。既往の研究により、anammox細菌の活性はpH8.3以上で阻害されるという報告がある⁴⁾。著者らの既往の研究において、微小電極を用いて生物膜内のpH分布を測定した結果によると、anammox活性により生物膜内では最大0.5 pHユニット程度液本体よりも高いことが確認されている⁴⁾。従って、ステップ流入導入前のPhase 1及びPhase 2における生物膜内部においては、pHがanammox細菌の最適培養条件 (pH = 6.7 - 8.3) の上限値を大幅に上回っている可能性がある。以上より、流出水のpHの上昇が8.0以下に抑制されたことにより、リアクター後半部のanammox活性が上昇したと考えられる。

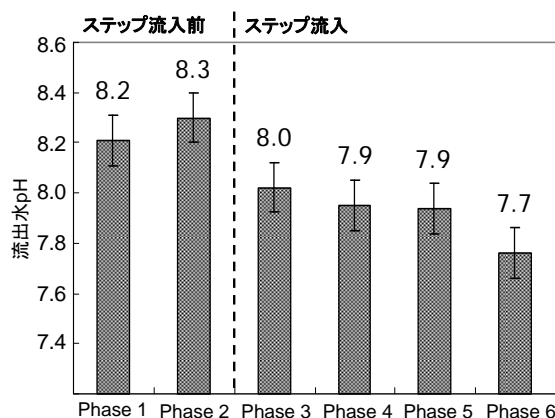


図4 流入水のpHを 7.2 ± 0.1 に設定した場合の各Phaseにおける流出水の平均pH

(4) 各区間におけるAnammox細菌の存在割合

バイオフィルムの切片化およびFISH法の手順は、Amann, 1995⁵⁾、Okabe et al., 1999⁶⁾の方法に準拠した。FISH法に用いた蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、全細菌に特異的なEUB338⁷⁾及び*Candidatus Brocadia anammoxidans* 特異的なAMX820⁸⁾の2種類である。本研究で用いたプローブは最新の16S rRNA sequencing databaseに基づくARB software package (<http://www.arb-home.de/>) のPROBE_DESIGN toolにより設計した。また、プローブの特異性はARB database により確認し、ハイブリダイゼーションの最適条件は実験により決定した。プローブはfluorescein isothiocyanate (FITC) またはtetramethylrhodamine 5-isothiocyanate (TRITC) で標識されたものを用いた。ハイブリダイゼーションは46°Cで3時間行い、その後48°C

で20分間洗浄を行った。ハイブリダイゼーションしたサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いて、波長488 nm (Arレーザー) と543 nm (HeNeレーザー) のレーザーでスキャンを行い観察した。

Phase 1 (リアクターの運転開始 5 日目) において、リアクター前半部 (Zone A)、中間部 (Zone B + Zone C)、及び後半部 (Zone D) のそれぞれの区間よりバイオマスを採取し FISH 法を行った。全細菌に特異的な配列を持つプローブ EUB338 及び *Candidatus Brocadia anammoxidans* に特異的な配列を持つプローブ AMX820 により蛍光標識し、EUB338 で標識された全細菌に占める AMX820 で標識された anammox 細菌の存在割合を算出した。その結果、ANAMMOX 細菌のリアクターの各区間での存在割合は、Zone A では 95%、Zone B 及び C では 94%、Zone D では 90%であり、anammox 細菌はどの区間においても極めて高い存在比で存在していた。

さらに、Phase 1 (リアクターの運転開始 5 日目) において、リアクター前半部 (Zone A) 及び後半部 (Zone D) のバイオマスを対象として、anammox 細菌に特異的なプライマーセット Pla46f 及び Univ1387r を用いて 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行うために、上向流カラムリアクターの前半部 (Zone A)、中間部 (Zone B + Zone C)、及び後半部 (Zone D) からそれぞれバイオマスサンプルを3つずつ採取し (前半部; 3.5 mL、中間部 2.0 mL、後半部 2.5 mL)、DNA 抽出を行うまで -80°C で冷凍保存した。その後、採取したサンプル 200 µL を Fast DNA Spin Kit (BIO101) を用いて DNA 抽出を行った。抽出された DNA は、Hoefer DyNA Quant 200 (Amersham) を用いて濃度 (ng/µL) を測定した。抽出された DNA は -20°C で保存した。抽出された DNA を Sigma の *Taq* DNA polymerase と *Planctomycetals* 目及び全細菌に特異的なプライマーセット Pla46f⁹⁾ 及び Univ1387r¹⁰⁾ を用いて PCR 増幅を行った。PCR プログラムは初期変性が 94°C で 5 min、[94°C: 90 sec, 62°C: 90sec, 72°C : 1 min] × 25 サイクル、最後に 72°C で 4 min とした。得られた PCR 産物は 1% アガロース電気泳動で確認した。PCR 増幅断片は、Wizard PCR Minipreps DNA purification system (promega) を用いて精製後、pGEM-T vector cloning system (Promega) を用いてトランスフォーメーションを行った。プラスミド DNA は Wizard Plus Minipreps DNA purification system (promega) を用いて回収・精製し、ほぼ 16S の全領域の塩基配列は ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) で決定した。得られた塩基配列は、BLAST を用いて相同性を比較した。また、CLUSTAL W パッケージを用いて Neighbour-Joining 法により系統樹を作成した。

系統解析の結果に基づいて作成した系統樹を図 5 に示す。その結果、リアクター前半部及び後半部において、それぞれ検出頻度 73%、96% の割合で同種の anammox 細菌のクローンが検出された。また、検出された anammox 細菌のクローンは *Candidatus Brocadia anammoxidans* に対して約 92~96% の相同性を有しており、新種の anammox 細菌である可能性が示唆された。以上より、本リアクター内には単一種の anammox 細菌が一様に存在している

ことが示唆された。

以上の様に、本研究では、上向流型 anammox リアクターの窒素除去性能の評価を行った。リアクターを二段ステップ流入方式とし、HRT を適宜短縮して連続運転を行うことにより、リアクター後半部の pH 上昇を抑制し、anammox リアクター後半部の anammox 活性を上昇・維持させることにより、anammox リアクター全体として、最大窒素除去速度 31.2 kg-N/m³/day を達成した。

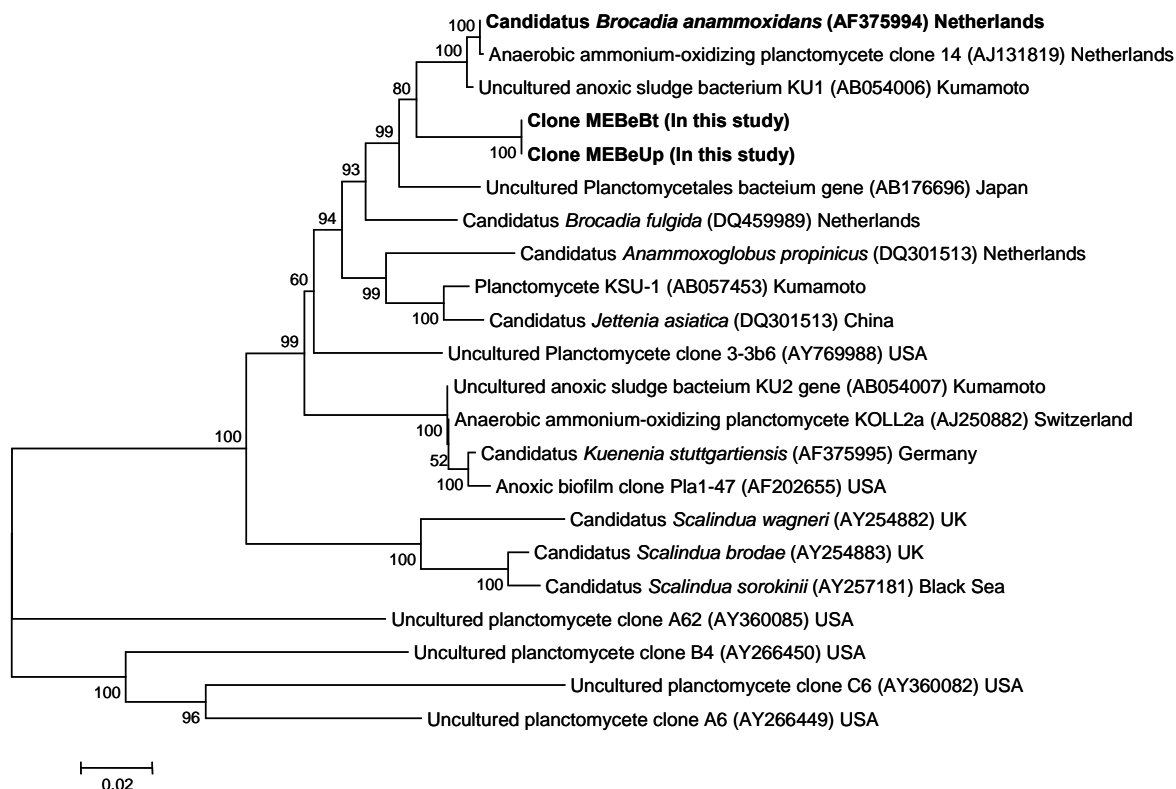
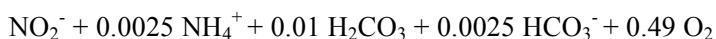
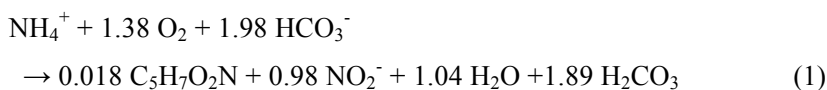


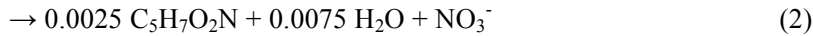
図 5 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析による anammox 細菌の系統樹(1438)

2. 5. 2 部分硝化プロセスの最適条件を検討

新規の窒素除去プロセスである anammox プロセスの導入においては、前段において亜硝酸性窒素の生産を行う部分硝化プロセスの確立が必要である。

部分硝化反応 (アンモニア酸化反応) はアンモニア酸化細菌 (AOB) によって担われ (1) に示す化学量論式で示されるが、生成した亜硝酸は直ちに亜硝酸酸化細菌 (NOB) によって硝酸にまで酸化される (2)。





本研究では、ヒドロキシルアミン (NH₂OH) を系内に添加することにより、部分硝化反応の迅速な安定化及び性能向上を図ることを目的とし、anammoxプロセスに応用可能な部分硝化プロセスの構築を目指すものである。また、DO濃度など部分硝化プロセスの最適条件を検討した。

2. 5. 2. 1 部分消化リアクターの処理効率

本研究では、植種汚泥として創成川下水処理場の曝気槽内の活性汚泥を使用した。汚泥を約 20 日間馴養させた後、ポリエステル製の不織布を生物膜担体として充填した (充填率 : 1%) 内径 45 mm、全長 500 mm、容積 800 mL のガラス製固定床型リアクター内に汚泥を植種した。人工無機培地及び空気をリアクター下部より連続供給することにより連続運転を行った。部分硝化リアクター内に供給した人工無機培地の構成及び培養条件を表 2 に示す。人工無機培地内には亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活性を抑制すると報告されている¹¹⁾ ヒドロキシルアミン (NH₂OH) を、250 μM となるように添加した。また、重炭酸添加量は (1) に示したアンモニア酸化細菌 (AOB) の化学量論式にならぬ、供給するアンモニア性窒素濃度に応じて変化させた。流入及び流出水中の各窒素態濃度は、イオンクロマトグラフィーにより測定した。さらに、リアクター内よりバイオマスを採取しリアクター内の菌体重量 (VSS) を測定した。

表 2 人工無機培地の構成及び培養条件

Synthetic Medium	[mg/L]	Running Condition	
(NH ₄) ₂ SO ₄	30-280	Temperature	38°C
KHCO ₃	430-3140	Influent pH	7.8±0.1
KH ₂ PO ₄	27	HRT	4 h
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300	Air flow rate	100 - 200 mL/min
CaCl ₂ ·2H ₂ O	180	Volume	800 mL
Trace Element Solution (TES I, TES II)			
NH₂OH	(250 μM)	0.017	

(1) 処理性の経日変化

窒素負荷量、亜硝酸生成速度、硝酸生成速度、及び曝気量の経日変化を図 6 に示す。部分硝化リアクターの運転開始後、曝気量を 100 ml/min 程度、HRT を 4 h に固定した状態で窒素負荷量のみを増加させた結果、リアクターの運転開始後 80 日間で 0.61 kg-N m⁻³ day⁻¹ の亜硝酸生成速度に到達した。また、硝酸生成速度は 0.03 kg-N m⁻³ day⁻¹ 以下で安定的に推移し、良好な部分硝化反応が確認された。次に、窒素負荷量を急激に低下 (1.1→0.2 kg-N m⁻³ day⁻¹) させたところ、亜硝酸生成速度の低下とともに硝酸生成速度が急激に上昇し、完全硝化の進行が確認された。ここで、完全硝化確認前の状態を Phase 1、完全硝化確認後の状態を Phase 2 と定義することにする。

さらに、Phase 2 において完全硝化から部分硝化への回復が確認された後、系内へのヒドロ

キシルアミン (NH₂OH) の添加を取り止めた状態でリアクターの運転を行った結果、Phase 2 における部分硝化回復時と同様の状態を維持することが可能であった。このヒドロキシルアミン (NH₂OH) の添加を取り止めた後の状態を Phase 3 として定義する。また、ヒドロキシルアミン (NH₂OH) の添加を取り止めた後、曝気量を 200 ml/min 程度に増加させた状態を Phase 4 として定義する。

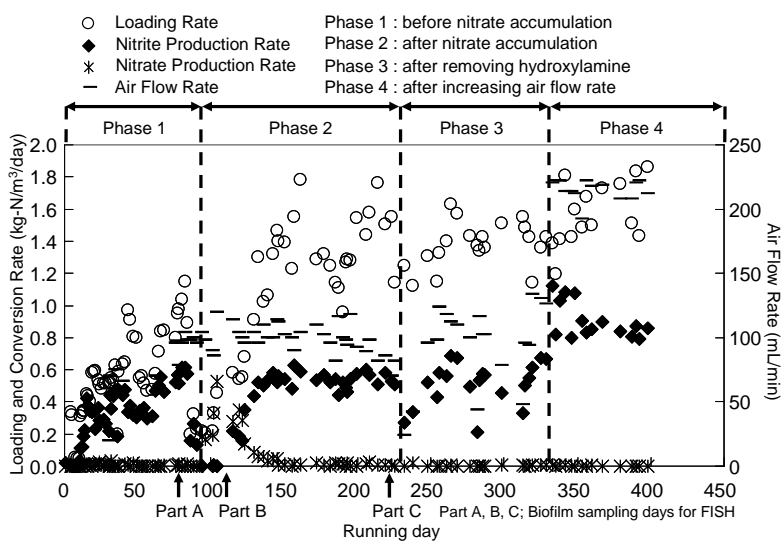


図 6 窒素負荷量、亜硝酸生成速度、及び硝酸生成速度の経日変化

(2) 完全硝化確認前 (Phase 1) における比アンモニア酸化活性

Phase 1 における亜硝酸生成速度が最大に達した後、亜硝酸生成速度を単位菌体重量 (g-VSS) あたりの値に変換した比アンモニア酸化活性の値を算出した結果 $0.27 \text{ g-N g-VSS}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。ここで、既往の報告における最大比アンモニア酸化活性の値を表 3 に示す。本研究における比アンモニア酸化活性の値は $0.27 \text{ g-N g-VSS}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であったが、この値は生物膜系による培養を行った報告より 2 倍以上高い値であった。これは、ヒドロキシルアミン (NH₂OH) により NOB の活性を抑制し、AOB のみを選択的かつ効率的に活性化することができたためであると考えられる。

表 3 既往の報告における最大比アンモニア酸化活

Specific ammonium oxidizing activity (g-N g-VSS ⁻¹ day ⁻¹)	System	Reference
0.17-0.29	Suspended	Tokutomi, 2004 ¹²⁾ Yang et al., 2003 ¹³⁾
0.08-0.10	Biofilm	Garrido et al., 1997 ¹⁴⁾ Yun and Kim, 2003 ¹⁵⁾
0.12	Biofilm	Chung et al., 2007 ¹⁶⁾
0.27	Biofilm	In this study

(3) 完全硝化確認後 (Phase 2) における処理性

Phase 2 における各窒素負荷量に応じたアンモニア消費速度、亜硝酸生成速度、硝酸生成速度、及びフリーアンモニア (NH_3) 濃度を図 7 に示す。低負荷領域 ($< 0.5 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) においては、完全硝化が確認されたが、窒素負荷量を増加させることにより、硝酸生成速度の低下とともに亜硝酸生成速度が次第に上昇していった。窒素負荷量が $1.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 程度以上となった後は、亜硝酸生成速度及び硝酸生成速度は Phase 1 と同程度に推移し、部分硝化の回復が確認された。また、流出水中のフリーアンモニア (NH_3) 濃度の増加に伴い、部分硝化反応が回復する傾向が確認された。Anthonisen ら⁷⁾は、フリーアンモニア (NH_3) 濃度が 0.1 mg/L 以上となった時に NOB の活性が抑制されたと報告しており、本実験においては、フリーアンモニア (NH_3) 濃度が 0.4 mg-N/L 程度となった時に硝酸生成速度の低下が確認されたことより、フリーアンモニア (NH_3) 濃度が NOB の活性抑制に寄与している可能性は高いと考えられる。以上より、窒素負荷量を高負荷側に設定することにより、部分硝化反応を安定化させることができる可能性が示唆された。

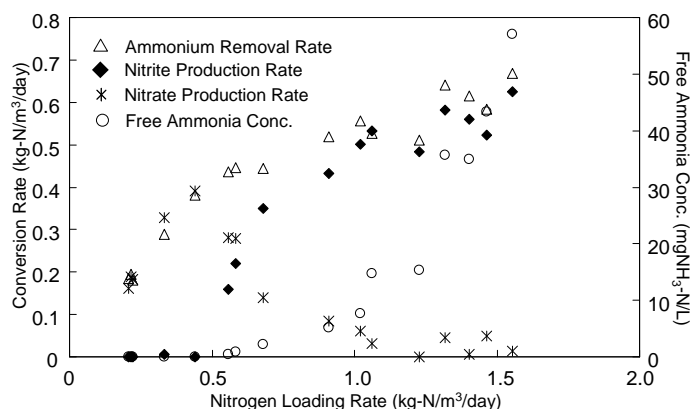


図 7 各窒素負荷量に応じたアンモニア消費速度、亜硝酸生成速度、硝酸生成速度、及びフリーアンモニア (NH_3) 濃度

(4) ヒドロキシルアミン (NH_2OH) 添加停止後 (Phase 3) における処理性

窒素負荷量を $1.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 以上の高負荷に保った状態でヒドロキシルアミン (NH_2OH) の添加を取り止めた後 (Phase 3) においても、亜硝酸生成速度は Phase 2 と同程度 ($0.6 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 付近) に推移した。このことから、ヒドロキシルアミン (NH_2OH) の系内への添加は、リアクターのスタートアップ時のみで十分であることが示唆された。また、ヒドロキシルアミン (NH_2OH) の系内への添加により部分硝化反応が安定した後は、ヒドロキシルアミン無添加の状態においても、窒素負荷量を $1.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 以上の高負荷に設定することにより、部分硝化反応を安定的に維持できる可能性が示唆された。

(5) 曝気量増加後 (Phase 4) における処理性

ヒドロキシルアミン (NH₂OH) の添加停止後において曝気量を 200 ml/min 程度に増加させた (Phase 4) 結果、最大亜硝酸生成速度 1.1 kg-N m⁻³ day⁻¹ を達成したが、その後速度の低下が確認され、亜硝酸生成速度は 0.9 kg-N m⁻³ day⁻¹ 程度で推移した。この速度の低下は曝気量の増加による生物膜の剥離及び流出が原因であると考えられる。

曝気量と亜硝酸生成速度との相関を図 8 に示す。図 8 より曝気量と亜硝酸生成速度との間には高い正の相関 ($R^2 = 0.84$) が認められ、このことから本研究における部分硝化反応の律速因子は電子受容体である溶存酸素量である可能性が示唆された。

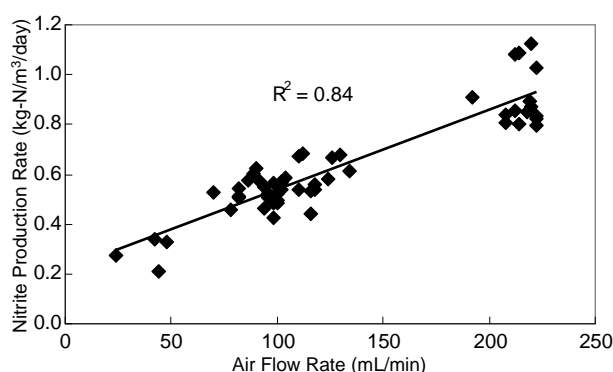


図 8 曝気量と亜硝酸生成速度との相関

(6) FISH 法による完全硝化確認前後における菌相解析

部分硝化確認時の Phase 1、完全硝化確認時の Phase 2、及び部分硝化回復時の Phase 3 において、リアクター内よりバイオマスを採取し FISH 法を行い、各硝化細菌の存在割合を算出した。FISH 法に用いた蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、*Nitrosomonas* spp. (AOB) に特異的な NEU (5'-CCCCTCTGCTGCACTCTA-3'), Phylum *Nitrospira* (NOB) に特異的な Ntspa712 (5'-CGCCTTCGCCACCGGCCTTCC-3'), 及び *Nitrobacter* spp. (NOB) に特異的な NIT3 (5'-CCTGTGCTCCATCCG-3') の 3 種である。完全硝化確認前の Phase 1 (Part A) においては、*Nitrosomonas* spp. に特異的な NEU の蛍光が確認されたが、Phylum *Nitrospira* 及び *Nitrobacter* spp. に特異的な Ntspa712 及び NIT3 の蛍光は確認されなかった。次に Phase 2 で完全硝化確認後の状態 (Part B) においては、NEU 及び Ntspa712 の蛍光がそれぞれ確認された。さらに、Phase 2 で部分硝化回復後の状態 (Part C) においては、NEU の蛍光が顕著に見られたが、Ntspa712 の蛍光もごく僅かに確認された。しかし、Part B 及び Part C においても Part A 同様 NIT3 の蛍光は確認されなかった。また、各 Part における各硝化細菌 (*Nitrosomonas* spp., Phylum *Nitrospira*, *Nitrobacter* spp.) の存在割合を算出した結果、*Nitrosomonas* spp. は Part A では 34%、Part B では 9%、Part C では 47% 存在しており、完全硝化確認時における存在割合の低下、及び部分硝化回復時における存在割合の増加が確認さ

れた。また、Phylum *Nitrospira* は Part A では 0%、Part B では 4%、Part C では 2%存在しており、完全硝化確認時において存在が確認され、部分硝化回復時においてもごく僅かの存在が確認された。

以上の結果をまとめると、

- ・ ヒドロキシルアミン (NH_2OH) を $250 \mu\text{M}$ となるように系内に添加することで、迅速な部分硝化リアクターのスタートアップに成功し、運転開始後 80 日間で $0.61 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ ($0.27 \text{ g-N g-VSS}^{-1} \text{ day}^{-1}$) の亜硝酸生成速度に到達し、また、運転開始後 333 日目には最大亜硝酸生成速度 $1.1 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ を達成した。
- ・ 窒素負荷量を $1.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 以上の高負荷に設定することによって、完全型硝化反応から部分硝化反応への回復及び安定化が可能なが示唆された。
- ・ 高負荷運転に伴うフリーアンモニア (NH_3) 濃度の上昇が亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活性を抑制している可能性が示唆された。

2. 5. 3 人工廃水を処理する部分硝化-Anammox並列リアクターの開発

2. 5. 1で開発した Anammox リアクターと2. 5. 2で開発した部分消化リアクターを結合した、部分硝化-Anammox 並列型リアクターを作成し、人工廃水を用いて長期連続運転を行った。この実験により、流入基質としてアンモニア性窒素のみを部分消化リアクターに供給し、窒素ガス(N_2)まで直接変換することを試みた。部分消化リアクターからの溶存酸素の影響は少ないことが明らかとなった。しかしながら、曝気量を増加させると部分消化反応による pH の低下が顕著となり、後段の anammox 活性を阻害した。従って、部分硝化と Anammox リアクターの間に、流量調整槽を設け pH の調節を行った。その結果、後段の Anammox リアクターの最大窒素除去速度 $6.2 \text{ Kg-TN/m}^3/\text{d}$ を達成した。今後は、全体の窒素除去速度を制限する部分消化反応をいかに促進させるかが鍵であり、部分消化リアクター内にアンモニア酸化細菌を優先的に高密度に保持できるよう、担体の選択や運転方法を検討する予定である。

2. 5. 4 Anammox 細菌のメタゲノム解析

集積培養された anammox 細菌から全 DNA を抽出し、メタゲノム解析を実施し、anammox 細菌のゲノム(ドラフト)を決定した。現在は、anammox 細菌のゲノム情報に基づき、重要な代謝酵素遺伝子(例えばヒドロキシルアミン酸化還元酵素(HAO)およびヒドラジン酸化還元酵素の遺伝子など)を同定し、これを既存の酵素遺伝子と比較している。また、炭素固定(同化反応)経路を解析し、増殖に係わる因子(コファクターやその他の基質など)を探索する。これらの結果をもとに最適運転条件を検討する予定である。

参考文献

- 1) Tsushima, I., T. Kindaichi, and S. Okabe. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research*, Vol. 41, pp. 785-794, 2007.

- 2) **Tsushima, I., Y. Ogasawara, T. Kindaichi, and S. Okabe.** Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Reserch*, Vol. 41, pp. 1623-1634, 2007.
- 3) **Kindaichi, T., I. Tsushima, Y. Ogasawara, M. Shimokawa, N. Ozaki, H. Satoh, and S. Okabe.** *In situ* Activity and Spatial Organization of Anammox Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. **73** (15), Pp. 4931-4939.
- 4) **Jetten, M. S. M., M. Strous, K. T. van de Pas-Schoonen, J. Schalk, U. G. J. M. van Dongen, A. A. van de Graaf, S. Logemann, G. Muyzer, M. C. M. van Loosdrecht, and J. G. Kuenen.** The anaerobic axidation of ammonium. *FEMS Microbiology reviews*, Vol. 22, pp. 421-437, 1999.
- 5) **Amann, R. I.,** *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, p. 1-15. In A. D. L. Akkerman, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.). *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- 6) **Okabe S., Satoh H., and Watanabe Y.** (1999) *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. **65** (7), Pp. 3182-3191.
- 7) **Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 22, pp. 434-444, 1999.
- 8) **Schmid, M., S. Schmitz-Esser, M. S. M. Jetten, and M. Wagner.** 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and *in situ* detection. *Environmental Microbiology*, Vol. 3, pp. 450-459, 2001.
- 9) **Neef, A., R. Amann, H. Schlesner, and K. H. Schleifer.** Monitoring a widespread bacterial group in *in situ* detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*, Vol. 144, pp. 3257-3266, 1998.
- 10) **Weisberg, W., S. Barns, D. Pelletier, and D. Lane.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *The Journal of Bacteriology*, Vol. 173, pp. 697-703, 1991.
- 11) **Kindaichi, T., S. Okabe, H. Satoh, and Y. Watanabe.** Effects of hydroxylamine on microbial community structure and function of autotrophic nitrifying biofilms determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Water Science and Technology*, Vol. 49, pp. 61-68, 2004.
- 12) **Tokutomi, T.** Operation of a nitrite-type airlift reactor at low DO concentration. *Water Science and Technology*, Vol. 49, pp. 81-88, 2004.
- 13) **Yang, W., J. Vllertsen and T. Hvitved-Jacobsen.** Nitrite accumulation in the treatment of wastewaters with high ammonia concentration. *Water Science and Technology*, Vol. 48, pp. 135-141, 2003.
- 14) **Garride, J. M., W. A. J. van Benthum, M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen.** Influence of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 53, pp. 168-178, 1997.
- 15) **Yun, H. J. and D. J. Kim.** Nitrite accumulation characteristics of high strength ammonia wastewater in an autotrophic nitrifying biofilm reactor. *Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology*. Vol. 78, pp. 373-

383, 2003.

- 16) **Chuang, H. P., A. Ohashi, H. Imachi, M. Tandukar and H. Harada.** Effective partial nitrification to nitrite by down-flow hanging sponge reactor under limited oxygen condition. *Water Research*, Vol. 41, pp. 295-302, 2007.
- 17) **Anthonisen, J. E., R. C. Loehr, T. B. S. Prakasam, and E. G. Srinath.** Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF*, Vol. 48, pp. 835-852, 1976.

2. 6 バイオフィルム工学による微生物のデザイン化の研究開発

(委託先：北海道大学地球環境科学研究所)

固体表面上に付着した微生物群が形成する高次構造体をバイオフィルム（狭義）と呼ぶ。広義において微生物群の凝集体であるフロックやペリクルなどもバイオフィルムとみなすことができる。バイオフィルムを形成している細胞は密度依存的な相互作用に支配されているため浮遊細胞には見られない特異な遺伝子発現プロフィールをもち、環境ストレスにも高い耐性を発揮する。つまりバイオフィルムは環境微生物の生存戦略であるとともに自然界における主要な存在形態であるため、バイオフィルムという視点を導入することによってはじめて複合微生物系における微生物間相互作用を正しく理解することができる。そこで本研究開発項目では有用微生物群によるバイオフィルム形成の分子機構を理解し、これを制御すること（バイオフィルム工学）によって廃棄物処理あるいは物質生産システムを効率化・安定化するための技術基盤開発を目的とする。具体的には以下の4つの小課題について取り組んでいる。

2. 6. 1 海洋環境におけるバイオフィルム内での微生物間相互作用の解析とデザイン化基盤の開発

栽培漁業場の稚魚養殖水槽において、底泥表面に有用なバイオフィルムが形成されると腐敗によるアミン類あるいは硫化水素の発生が抑えられ、稚魚にとって良好な水質が維持できることが経験的に知られている。この観察はバイオフィルムを形成する細菌群の中に残餌や排泄物（廃棄物）を速やかに分解する能力を有するものが含まれていることを強く示唆する。そこでまず瀬戸内海栽培漁業場およびその沿岸素掘池底泥に形成されたバイオフィルムから単離した約 30 株の細菌種について実験室内環境におけるバイオフィルム形成活性を調べた。次にこれらを網羅的に2種類ずつ組み合わせて複合バイオフィルムを形成させた。その結果、相加量以上にバイオフィルム形成量が増大（促進）するものや逆にバイオフィルム形成が減少（阻害）される組み合わせを複数見出した。

続いてこの促進作用が細胞同士の接触による物理的相互作用によるものか、あるいは細胞外に分泌されるシグナル分子を介した間接的な相互作用によるものかについて検討した。その結果、ある属細菌の培養液上清中に分泌される高分子量シグナル分子（BAF: Biofilm Activating Factor）が濃度依存的（050%の範囲において）にバイオフィルム形成を促進することが明らかとなった。これまでに、細菌細胞間で情報伝達を仲介する低分子シグナル分子はいくつか報告されているが、高分子化合物でこのような作用を有するものの報告はない。今後、BAF の精製と構造解析を進め、本物質の適用範囲（アンモニア酸化細菌や廃棄物分解細菌のバイオフィルム形成促進効果の有無など）について検討する予定である。

また、バイオフィーム形成細菌と残餌分解活性（プロテアーゼ活性）との相関について検討した結果、*Pseudoalteromonas* 属細菌の多くの種がバイオフィーム形成に依存したプロテアーゼ生産性を示した。すなわち、バイオフィームを形成することによって長期的なプロテアーゼ生産活性が持続し、残餌分解の効率化に有効な作用をもたらすことが明らかとなった。さらにバイオフィーム形成に依存して生産されるプロテアーゼ遺伝子（*bmpI*と命名）を特定することに成功した（S. Iijima *et al.* 2009）。

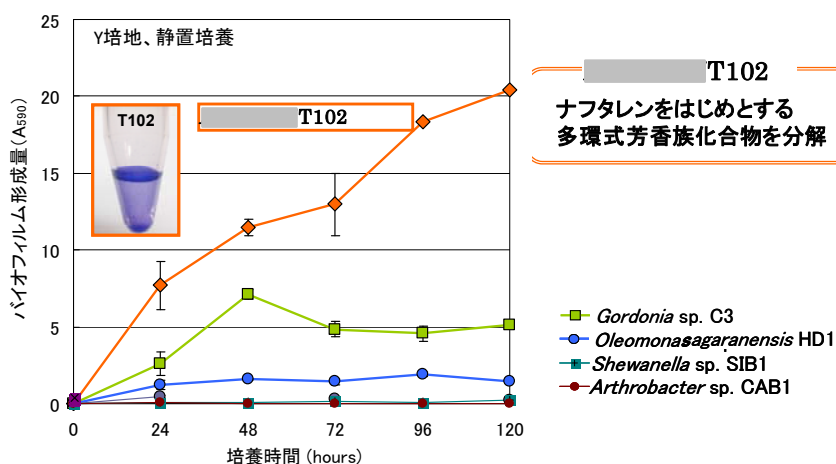
今後、BAF によるバイオフィーム形成促進とプロテアーゼ遺伝子発現促進の相乗効果について検討を進める。

2. 6. 2 炭化水素類による土壤汚染浄化のためのバイオフィーム工学の基盤開発

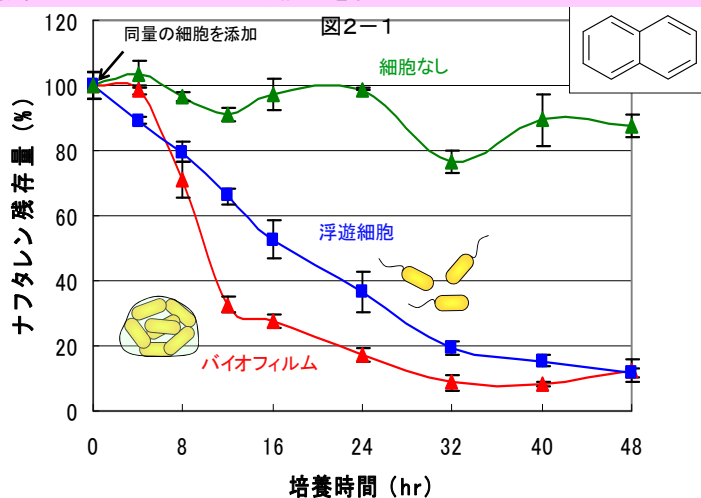
廃棄物汚染現場に有効な分解細菌を投入する生物環境修復技術（バイオオーギュメンテーション）においてしばしば起こる問題として、投入した細菌の定着率の低さおよび分解活性発現量の低さが指摘されている。前者は投入細菌が土着大型微生物による捕食を受けることや土壌細菌との生存競争に脆弱であることが原因とされ、後者は生育条件（栄養、酸素濃度など）が実験室と大きく異なることが原因と考えられる。

そこで汚染物質分解細菌を通常のフラスコ振とう培養による浮遊細胞のままではなく、あらかじめこれらをバイオフィーム化させた後に現場へ投入する方法によってこれらの問題を解決する糸口を掴めるのではないかと考え研究を進めた。まず、われわれの研究室保有の石油分解細菌 7 属菌種についてポリプロピレンチューブやガラス表面におけるバイオフィーム形成能を調べた。その結果、ナフタレンやジベンズチオフェンなどの多環式芳香族炭化水素化合物を分解する T102 が極めて良好なバイオフィーム形成能

バイオフィーム形成能力の比較



炭化水素化合物分解細菌のなかで T102 は抜群のバイオフィーム形成能力を有していた



バイオフィーム細胞の方が浮遊細胞よりも高速に分解

図2-2

力を有していることを見出した（図2-1）。

次に T102 のナフタレン分解活性を経時的に調べたところ、浮遊細胞では培養開始直後からゆるやかに分解が開始するのに対して、バイオフィーム細胞では分解開始までに4時間程度の準備期（lag time）が必要であった（図2-2）。しかし、4時間後以降は極めて速やかな分解が見られた。例えばナフタレン初期添加量（20 ppm）の70%程度を分解するのに要する時間で比較した場合、浮遊細胞では28時間を要するのに対してバイオフィーム細胞では12時間程度であった。このことから、バイオフィーム細胞は分解開始まで時間を要するものの一旦分解が始まるとナフタレンを高速分解できる特性を有することが明らかになった（図2-2）。さらに48時間後の生菌数（CFU: colony forming units）を比較したところ浮遊細胞に比べてバイオフィーム細胞の方が2倍程度高いことが分かった。

次に実際の原油汚染土壌を用いてバイオフィームの有用性を検証した。

原油汚染土壌を採取し T102 株を浮遊細胞あるいはバイオフィーム細胞状態で投入した際の定着率を比較した。バイオフィーム細胞の投入法は以下のように行った。まず、あらかじめ液体栄養培地を用いた静置培養によって培養ガラス瓶内壁に T102 バイオフィームを形成させた。培養液を除いた後、同ガラス瓶に汚染土壌を入れてボルテックスミキサーによって攪拌してガラス瓶内壁から T102 バイオフィームを剥離し土壌中に分散させた。また対照実験としてあらかじめ液体栄養培地で振とう培養した浮遊細胞培養液の一部をそのまま汚染土壌に添加した。なおいずれの実験区も正確に同じ生菌数、同じ培養液量でナフタレン蒸気下において行った。

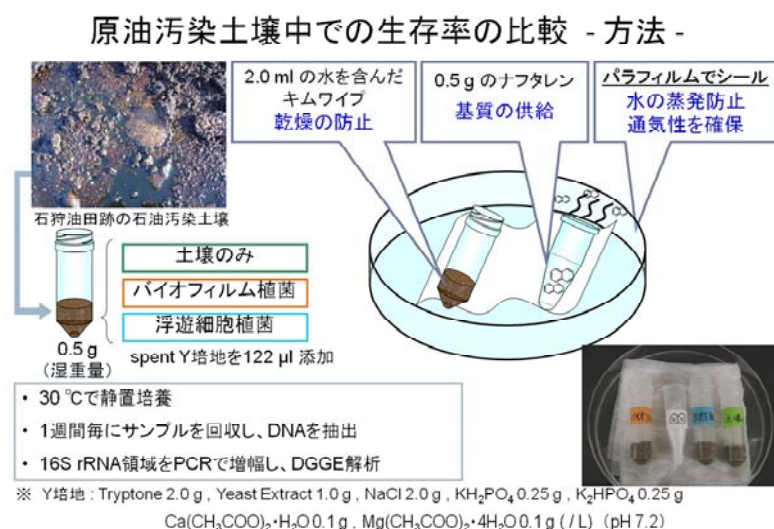
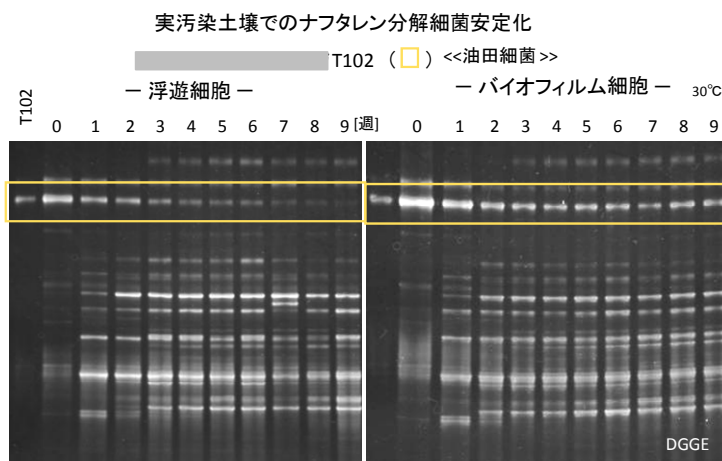


図2-3

これら2通りの方法により汚染土壌に投入した T102 株の定着率を10週間にわたって比較した。細胞数は16S rRNA 遺伝子を鋳型とした PCR (polymerase chain

reaction) により増幅した DNA を DGGE (denaturant density gradient gel electrophoresis) 法で分析し、Cyber Green により染色された DNA バンドの濃淡によりデンストグラフ定量した (図 2-4)。その結果、T102 株の細胞数の減少は浮遊細胞にくらべてバイオフィーム細胞で投入した方で少し改善された。特に、9 週間後における残存量の違いは顕著であった。さらに 9 週間後においても T102 株バイオフィーム細胞はナフタレン分解活性を維持していることを別途確認した。以上のことから、あらかじめバイオフィーム化させた細胞は過酷な汚染現場環境においても長期間定着可能であり、活性を持続的に発揮できることが初めて定量的に示された。



バイオフィーム細胞の方が浮遊細胞よりも長期間安定であることを確認

図2-4

2. 6. 3 湖沼河川汚染浄化のための水草根圏バイオフィームの解析と活用技術の開発

近年、多種多様な化学物質の繁用にもなう環境汚染があらゆるところで問題となっている。環境に対する負荷の少ない汚染浄化技術の一つとして、微生物の優れた代謝能を利用したバイオレメディエーションがあり、特に低濃度広範囲の汚染に対する処理法としてコスト面で優れている。バイオレメディエーションの実用化へ向けた研究例は多いが、上で述べたとおり、汚染現場における微生物定着率の低さ、分解活性の低下、さらに栄養源や外来微生物の投入による富栄養化や生態系攪乱など新たな二次汚染発生の危険性といった問題も指摘されている。これらの問題を一挙に解決する方法として、植物と微生物の協働作用を利用した新しいバイオレメディエーション技術—根圏浄化技術—が注目されている。植物根の 0.1mm 程度の周囲を根圏と呼ぶ。根圏では植物代謝 (光合成作用) により生成される糖、アミノ酸等の有機物、お

P2株、P23 株はアオウキクサへ強く付着し、培養液中にはほとんど残存しない

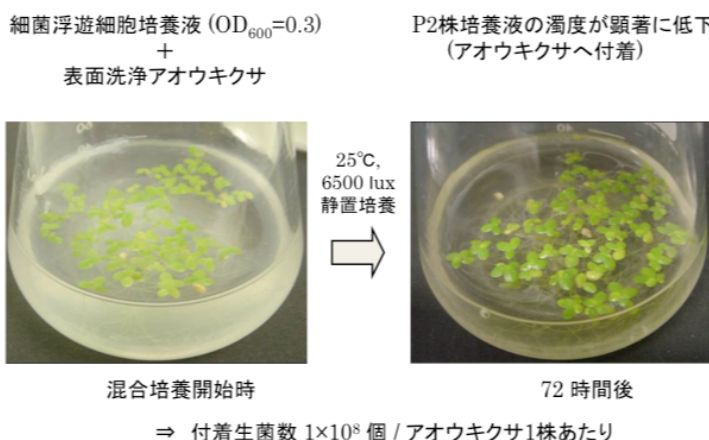


図3-1

よび酸素が豊富に存在する。微生物はこれらを求めて根圏へ集積し、その増殖や代謝が促進される。つまり、根圏では外部から栄養源や酸素を投入しなくても、汚染物質分解微生物の増殖や代謝能力を持続的に発揮させることが可能となる。さらに植物体へ強く付着し、植物に依存して増殖する分解微生物を用いることができれば、浄化後に植物体を除去することで二次汚染を回避できると考えられる。そこで、本研究開発小課題では植物根表面における微生物群のデザイン化を実現し、その有効性について実証することを目標とした。

対象汚染物質として石油系モデル炭化水素(フェノール、ナフタレン、原油)を用いた。供試水生植物は、アオウキクサ (*Lemna perpusilla*) を使用した。アオウキクサと共存する根圏微生物を根表面から遊離させ寒天平板法により単離した。高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーを用いてこれら菌株の炭化水素分解能を確認した。なかでも、P2 株および P23 株は優れたフェノール分解活性を有すると共に、アオウキクサ根表面へ強く付着することを発見した (図3-1)。

次にアオウキクサ根表面を蛍光顕微鏡で観察したところ、P2 株は非常に厚いバイオフィームを形成したのに対して、P23 株が形成するバイオフィームは比較的薄いものであった。アオウキクサ表面に形成された P23 株バイオフィームを遊離させて計測したところ、ウキクサ 1 株あたり最大 10^8 の細菌が付着していた (図3-2)。一方、合成樹脂であるポリプロピレンチューブへの付着能 (バイオフィーム形成能) も評価したが、アオウキクサ根表面バイオフィーム量との相関性は見られなかった。このことは植物根表面と細菌との間に特異な相互作用があることを示唆する。

続いて、アオウキクサ根表面に形成した P23 株バイオフィームのフェノール分解特性を洗浄前のアオウキクサ (常在根圏細菌あり) および洗浄アオウキクサ (根圏細菌なし) と比較した。それぞれの培養フラスコに 40 ppm のフェノールを 0、40、96 時間後に添加したところ、アオウキクサ根表

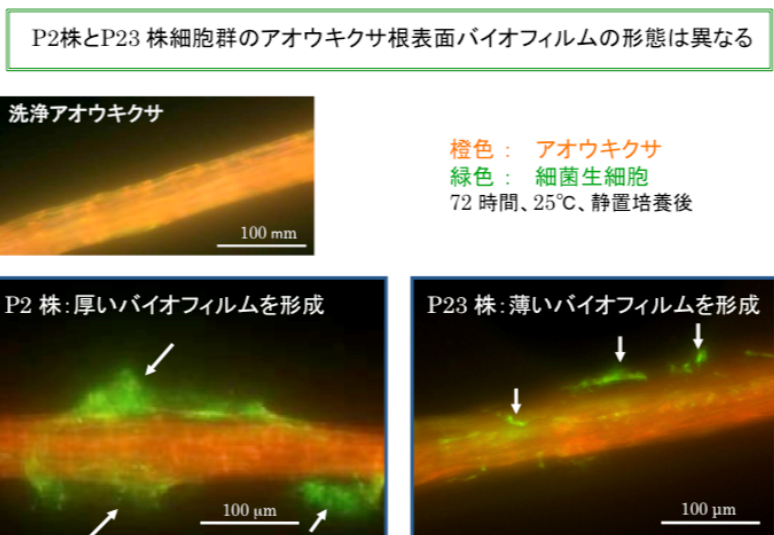


図3-2

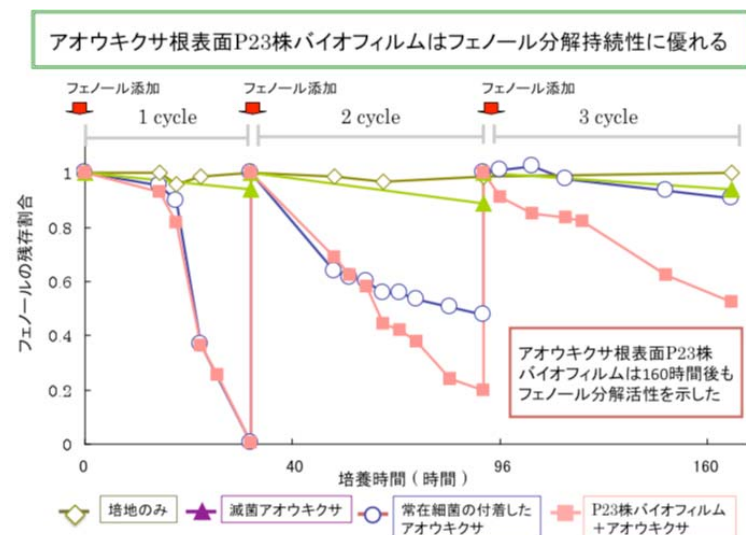


図3-3

面 P23 株バイオフィルムのフェノール分解持続性が最も優れていた。その分解活性は 160 時間以上に亘って持続した (図 3-3)。

ここでさらに興味深いことに、P23 株が根表面にバイオフィルムを形成しているアオウキウサは洗浄アオウキウサに比べて約 1.6 倍の成長速度 (葉状体数の増加) の促進が確認された。これはアオウキウサの生育促進根圏細菌 (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) として初めての報告である。そこで以上の成果をまとめて特許出願を行った (森川、山賀、鷲尾, 2009)。

この根圏浄化法は光と水があれば汚染浄化が可能であり、浄化後にウキウサを除去すれば微生物の残留の問題も回避できる理想的な方法といえる。今後、フェノール以外の有害な産業廃棄物 (環境ホルモンなど) の分解が可能な根圏細菌の探索など適用範囲を広げてゆきたいと考えている。

2. 6. 4 工業廃水処理槽 (硝化/脱窒過程) の効率向上のためのアンモニア酸化細菌群および ANAMMOX 細菌群の安定化技術の開発

現在、工業廃水や下水処理の主要工程は活性汚泥法による窒素化合物 (アンモニア)、有機物、リンの除去である。活性汚泥はさまざまな微生物群からなるフロック集合体であり、広義のバイオフィルムと見ることができる。ここで、アンモニア除去の第一段階をになうアンモニア酸化細菌は亜硝酸酸化細菌とともに独立栄養細菌であるため増殖速度が非常に小さく、ともに純粋培養が困難であるため生理学的特性の理解が遅れている。一方、アンモニア酸化細菌を含む活性汚泥は極めて複雑な複合微生物系であり、今日 PCR-DGGE 法や FISH 法などによって微生物群集構造解析は可能となったものの相互作用の解析は亜硝酸酸化細菌との共生作用が知られている以外は未解明の部分が多く残されている。また、好気性アンモニア酸化処理における曝気の必要性が処理コストを押し上げている。

これに対して嫌気性アンモニア酸化細菌 (ANAMMOX 細菌) 群の利用は次世代の廃水処理技術として期待されているが、世代時間が約 11 日と極めて遅く系の立ち上げに非常に長時間を要するため実用化にはまだ多くの課題がある。ここで嫌気性アンモニア酸化活性が顕著に発現する時期と目視できる程度の大きさのグラニューールが形成される時期と一致することが知られているので、我々はグラニューール形成を促進することによってアンモニア除去の効率化が可能になると考えている。

以上のことから、本研究開発小課題ではアンモニア酸化細菌のうち全ゲノム解析が終了している標準株 *Nitrosomonas europaea* を対象として、その細胞活性および安定性 (バイオフィルム化) の向上のために鍵となる新規細菌の探索を行うこと、および ANAMMOX 細菌の活性発現に重要と思われるグラニューール形成の分子機構の解析を目標とした。

まず、*N. europaea* バイオフィルムの有効性を検証した。すなわち、バイオフィルム形成を促進するために市販の担体（バイオキャリアサドル、バイオステージ、およびプラスチック筒）を添加して培養を行ったところすべての担体において、担体を入れない場合に比べて *N. europaea* のアンモニア代謝活性は向上した。また、硝化槽活性汚泥から *N. europaea* のアンモニア代謝活性に影響を及ぼす可能性のある細菌を探索した。その結果、活性を

40%程度増大させる細菌（ヘルパー細菌と命名）群と逆に活性を 50-70%阻害する細菌（ヒンダー細菌と命名）群の取得に成功した(図4-1)。

これまでに、*N. europaea* のアンモニア代謝産物である亜硝酸を介して栄養共生の関係にある亜硝酸酸化細菌が報告されているが、それ以外の細菌で *N. europaea* に影響を及ぼすものは報告例がない。今後、ヘルパー細菌やヒンダー細菌の作用が *N. europaea* との複合バイオフィルム形成によるものかなどについて検討を加える予定である。さらにこれら新規細菌の生理活性および増殖特性を詳細に調べるとともに、これらを制御することにより、アンモニア酸化細菌群の効率的デザイン化を目指す。

一方、グラニュールを形成した ANAMMOX 細菌より調製した細胞膜画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびペプチドシーケンサーにより解析し、著量発現している 2 種類のタンパク質を同定した。今後、これらのタンパク質の発現調節機構を詳細に検討し、グラニュール形成の促進を目指す。

N. europaea 活性を増大するヘルパー細菌および阻害するヒンダー細菌の候補を硝化槽から取得した！

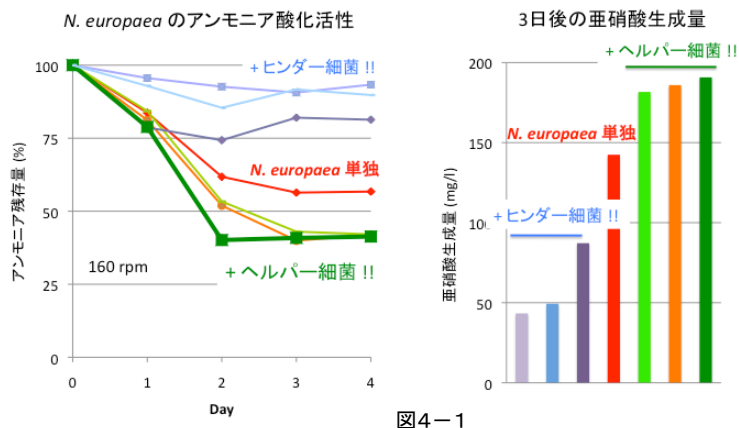


図4-1

2. 7 システム論的アプローチによる微生物コミュニティデザインの研究開発 (委託先：早稲田大学)

2. 7. 1 緒言

本研究開発では、排水処理システム内の微生物コミュニティを一つのシステムとして捉え、実験的解明およびシミュレーション解析を併用したシステム論的アプローチにより微生物コミュニティのデザインを行う。具体的には微生物グラニュールによる窒素・リン同時除去型排水処理システムをモデルケースとして、本テーマで開発するシステム論的アプローチを適用し、微生物コミュニティの最適化および処理性能の予測を行い、微生物コミュニティデザインの基盤技術として確立させる。さらに、確立した微生物コミュニティデザイン技術を、本研究開発プロジェクト内の他の好気性微生物処理システム（フロック・バイオフィーム・活性汚泥等）にも適用し、システムのデザイン化・高効率化を図る。

2. 7. 2 研究概要

(1) 背景

近年、分子生物学的手法による微生物生態解析の著しい発展により、排水処理システム内の複合微生物系を詳細かつ定量的に解析することが可能になった¹⁻³⁾。しかしその複雑さゆえ、たとえ個々の微生物に関する情報が正確に見積もられても生態系全体の理解に結びつけることは難しく、現行の要素還元型実験的アプローチのみの方法論では限界があることがわかってきた⁴⁾。従って、従来型の生態解析における限界を克服し複合微生物生態系における様々な現象を解明するためには、個々の微生物の現象に着目するのではなく生態系全体を一つのシステムとして捉えていくこと(システム論的アプローチ)が必要である。

本研究開発ではシミュレーションと実験データを併用するシステム論的アプローチに基づき、微生物コミュニティのデザインを行う。例えば飛行機や自動車といった複雑なシステムをデザインする際に、シミュレーションを用いた対象の可視化・仮想実験によるシステムの理解および性能予測は必要不可欠である。同様に排水処理システムにおいてもシステム論的アプローチによるシミュレーションを用いた微生物コミュニティデザインを行うことで、微生物コミュニティの最適化およびシステムの処理性能の予測が可能になり、排水処理システムの高効率化につながると考えられる。

(2) 本研究開発で提示する方法論

本研究開発では、現状では独立している実験的アプローチとシミュレーションモデル主体のアプローチを融合させること、すなわち微生物コミュニティという複雑な生命現象を解明するためにシミュレーションモデルを構築し、実験結果と照らし合わせながら系全体の現象を解明するシステムバイオロジーの方法論を採り入れる(図1)。特に、実験的手法および知識工学的手法を併用してコンピュータ上に微生物コミュニティを再構築し、微生物生態形成メカニズムの理解、それに基づく微生物コミュニティの人為的かつ直接的なデザインおよびコントロールを実現する新規方法論を確立させる。

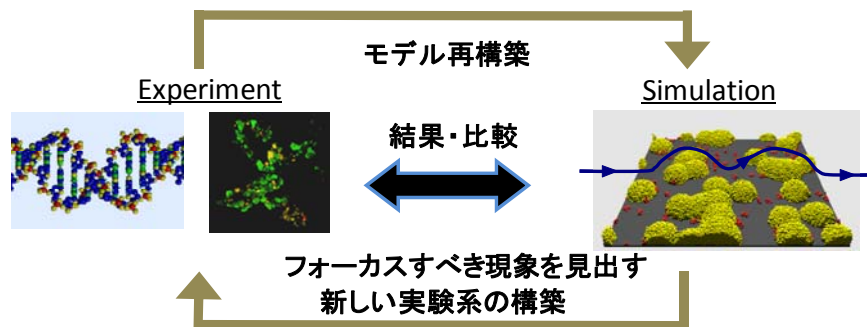


図1. 実験的アプローチとシミュレーション解析の有機的結合

(3) 研究の進め方

本研究開発で提示するシステム論的アプローチによる微生物コミュニティデザインを基盤技術として確立するために、モデルケースとして窒素・リン同時除去型排水処理システム⁵⁾に本アプローチを適用する。本処理法は硝化細菌および脱窒機能を持ったリン蓄積細菌(脱窒性リン蓄積細菌)の2種の細菌を用いることによって窒素・リンの同時除去が行われる。しかしながら、硝化細菌は酸素を必要とし、脱窒性リン蓄積細菌は嫌気・無酸素条件を必要とするため、従来法では単一槽内にこれらの細菌を共存させることは困難であった。したがって、高効率で安定的な窒素・リン同時除去手法を確立するためには、これらの細菌が共存可能な新たな微生物生態系をデザインすることが不可欠である。

そこで、細菌自身の凝集作用によって形成される粒状の微生物グラニュールに着目し、システム論的アプローチを用いて、グラニュール外部の好気部位に硝化細菌、内部の無酸素部位に脱窒性リン蓄積細菌を生育させるための処理システム操作条件の予測を行い、硝化細菌と脱窒性リン蓄積細菌が共存できる新たな反応場のデザインを行う(図2)。さらに、確立したシステム論的アプローチによる微生物コミュニティデザイン技術を本研究開発プロジェクト内の他の好気性微生物処理システム(フロック・バイオフィルム・活性汚泥等)に適用する。

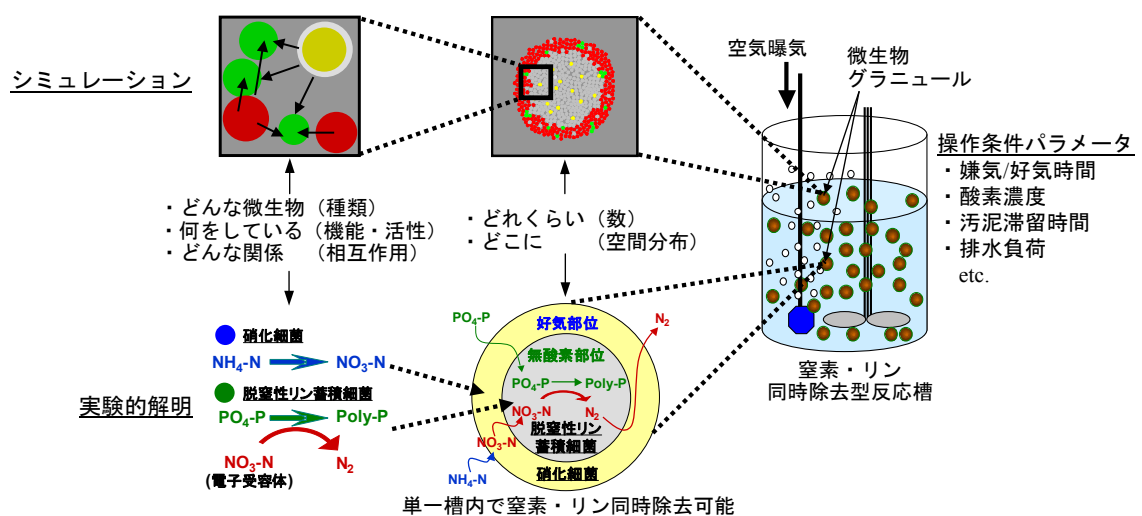


図2. システム論的アプローチの窒素・リン同時除去型排水処理システムへの適用

2. 7. 3 研究目的および目標

(1) 研究目的

本研究では、排水処理システム内の微生物コミュニティを一つのシステムとして捉え、実験的解明およびシミュレーション解析を併用したシステム論的アプローチにより微生物コミュニティのデザインを行うことを目的とする。

中間目標としてまず、本テーマで開発するシステム論的アプローチを、モデルケースとしてアンモニア除去および窒素・リン同時除去型排水処理システム内の微生物グラニュールに適用し、微生物コミュニティの最適化および処理性能の予測を行う。次に、これらの方法論を微生物コミュニティデザインの基盤技術として確立させ、本研究開発プロジェクト内の他の好気性微生物処理システム（フロック・バイオフィルム・活性汚泥等）にも適用し、システムのデザイン化・高効率化を図ることを最終目標とする。

実施計画書の間目標を以下に提示する。

(2) 中間目標

① アンモニア除去および窒素・リン同時除去システム内有用細菌群のパラメータ取得

アンモニア除去および窒素・リン同時除去システム内で反応に関わる4～5種類の有用細菌群を見出し、増殖に関するパラメータ（増殖速度、基質親和性、増殖収率など）を呼吸活性測定および分子生態学的手法（FISH法、微小電極など）を併用し、分離・培養の操作無しに測定する。

② 微生物コミュニティ形成に関するシミュレーションモデルの構築

細菌間の相互作用、空間分布などを考慮したシミュレーションモデルを構築し、アンモニア除去および窒素・リン同時除去システム内の微生物グラニュールに適用する。

③ アンモニア除去および窒素・リン同時除去型排水処理システムの運転

微生物グラニュールによるアンモニア除去および窒素・リン同時除去型リアクター（実験室スケール）を構築し、排水処理能力等の実験データを蓄積する。

④ 分子生物学的手法による微生物コミュニティの実験的解明

分子生物学的手法を用いてアンモニア除去および窒素・リン同時除去システム内の微生物グラニュールに関する微生物コミュニティの実験的解明を行う。

⑤ システム論的アプローチのアンモニア除去および窒素・リン同時除去システムへの適用

システム論的アプローチをアンモニア除去および窒素・リン同時除去システムへ応用することで処理槽運転中の微生物コミュニティ生態の変化や全体としての機能や活性を予測し、高効率かつ安定的な処理を行う上で最適な設計条件・操作条件を求める。

2. 7. 4 研究内容

(1) アンモニア除去および窒素・リン同時除去システム内有用細菌群のパラメータ取得

微生物の生態をより高度に再現できるモデルを構築するために、実験によって有用細菌群のパラメータを取得した。具体的には、アンモニア除去および窒素・リン同時除去システム内で反応に関わる5種類の有用細菌群を見出し、増殖に関するパラメータ（増殖速度、基質親和性、増殖収率など）を呼吸活性測定を併用し、分離・培養の操作なしに測定を行った。その結果、アンモニア酸化細菌（AOB）、亜硝酸酸化細菌（NOB）の2菌種、*Nitrobacter* と *Nitrospira*、および従属栄養細菌（Het）のそれぞれについて、増殖速度（ μ_{max} ）、増殖収率（Y）、基質親和性（ K_s ）、酸素の半飽和定数（ K_{O_2} ）のパラメータを取得した。これらのパラメータ値は、微生物による基質の取り込み速度（ $d[S]/dt$ ）が下記の Monod 式で表されるとして算出したものである。

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{\mu_{max}}{Y} \cdot \frac{[S]}{K_s + [S]} \cdot \frac{[O_2]}{K_{O_2} + [O_2]} \cdot X$$

また、リン蓄積細菌（PAO）に関しては、有機物取り込み速度（q）、基質親和性（ K_s ）、酸素の半飽和定数（ K_{O_2} ）をそれぞれ測定した。

(2) アンモニア除去および窒素・リン同時除去型排水処理システムの運転

半回分式リアクター（SBR）（実験室スケール）を使用して窒素・リン同時除去型排水処理システムを構築した。リアクターの構成と外観を図3に示す。このリアクターの運転を通して、数学モデルの構築・修正に必要な実験データを蓄積した。

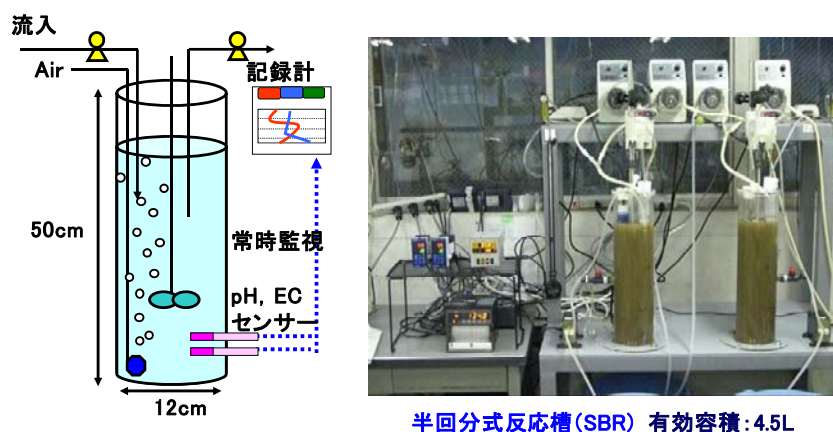


図3. 窒素・リン同時除去型リアクター

具体的にはSBRサイクルにおける好気時間が70分の系（R1）と110分の系（R2）の2系を立ち上げ、排水処理能およびグラニューール形成に関する各種データを取得

した。流入する排水の組成を DOC:150mg/l, T-N: 60mg/l, T-P: 10mg/l とし、SBRの容積交換比 (VER) を 1/3 としたときの、R1およびR2による処理水質の経日変化を図4に示す。図4 (A) は好気時間が短い系 (R1) での結果であるが、運転開始後10日前後からアンモニアの処理が悪化し、それに伴ってMLSSも減少し、28日目にMLSSが 1000mg/l を下まわったためR1の運転を中止した。以上の結果は、好気時間が短かったために硝化細菌の増殖が抑制され、沈降性の高いグラニューールが形成されず、リアクター内に細菌を保持することが困難になったことによるものと考えられる。一方、好気時間が長い系 (R2) では、図4 (B) に示すように運転開始から100日以上にわたって窒素・リンの同時除去がほぼ実現している。この結果より、窒素・リン同時除去システムにおいて、SBRの好気時間というマクロなパラメータが、排水処理能やグラニューール形成維持に重要な影響を及ぼすことを実験的に示すことができた。

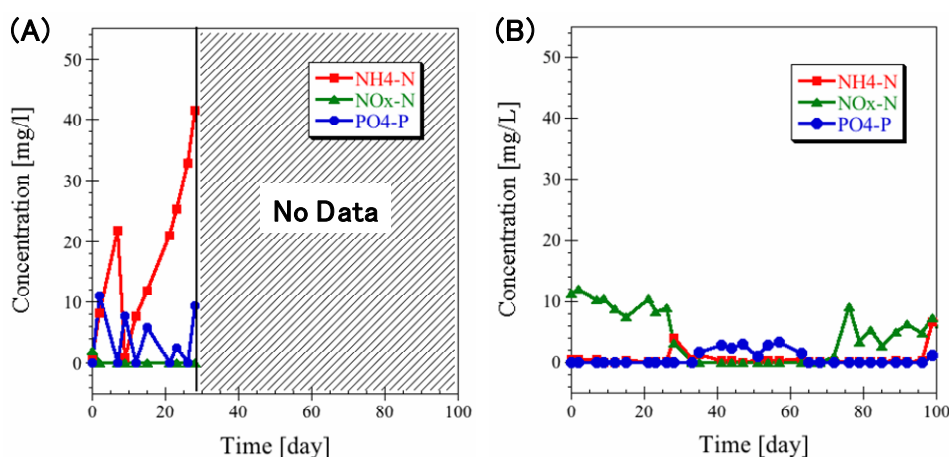


図4. 処理水質の経日変化：(A) 好気時間 70 分 (R1) (B) 好気時間 110 分 (R2)

(3) 分子生物学的手法による微生物コミュニティの実験的解明

上記排水処理システムで得られた微生物グラニューールについて微生物コミュニティの実験的解析を行った。Fluorescent in situ hybridization (FISH)法により初期汚泥中のアンモニア酸化細菌(AOB)、亜硝酸酸化細菌 (NOB)、リン蓄積細菌 (PAO) の割合を測定し、その後グラニューールの形成過程をモニタリングした。その結果、PAO およびAOBがグラニューール内に優占的に存在していることから、各々の微生物群の働きにより窒素・リン同時除去が達成されていることが解明された。今後、定量的な解析を進めていく必要がある。

(4) 微生物コミュニティ形成に関するシミュレーションモデルの構築

上記排水処理システムを対象として、シミュレーションモデルを構築した。微生物グラニューールが形成される過程は大きな時空間スケールにわたる現象であるため、モ

デル化には工夫が必要である。本研究では空間スケールの異なる2種類のモデル、すなわちリアクタースケールモデル（マクロモデル）とグラニューールスケールモデル（マイクロモデル）を独立に構築し、それらを適切に接続するというマルチスケールモデリングの戦略をとった（図5を参照）。以下に、マクロモデル・マイクロモデルで共通して用いる微生物反応モデル、マクロモデルおよびマイクロモデルの構築内容について、それぞれ述べる。

① 基礎となる微生物反応モデルの構築

窒素・リンを同時に除去する微生物反応系として、アンモニア酸化細菌（AOB）、亜硝酸酸化細菌（NOB）、従属栄養細菌（Het）、およびリン蓄積細菌（脱窒性のものを含む）（PAO）の4菌種による20の微生物反応を、活性汚泥モデル(ASM2d)⁶⁾や各種文献⁷⁻⁹⁾を参考に構築した（図6）。

マルチスケールモデリング

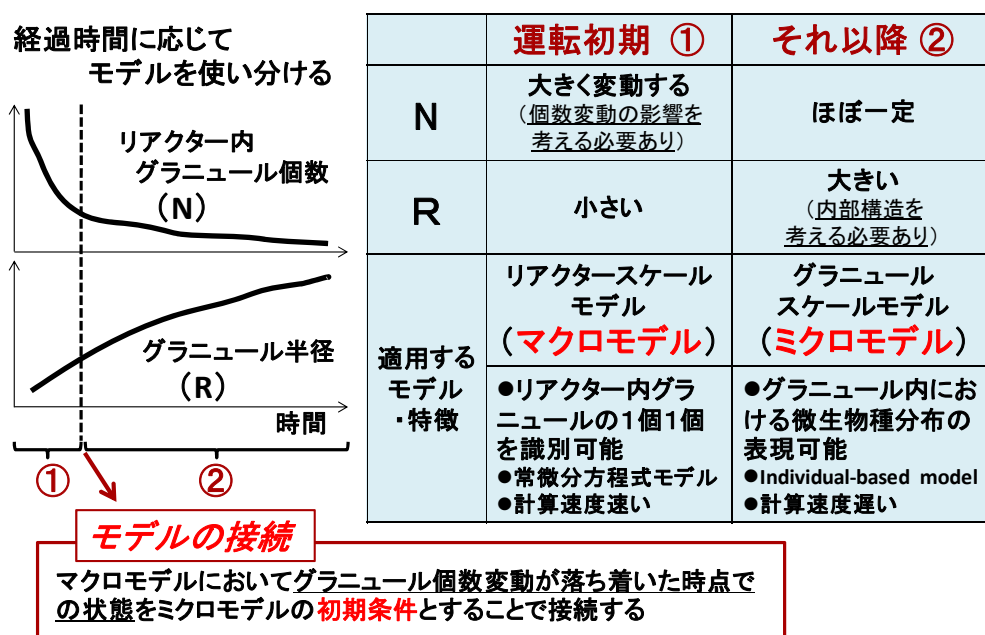


図5. 本研究開発で用いるマルチスケールモデリング戦略

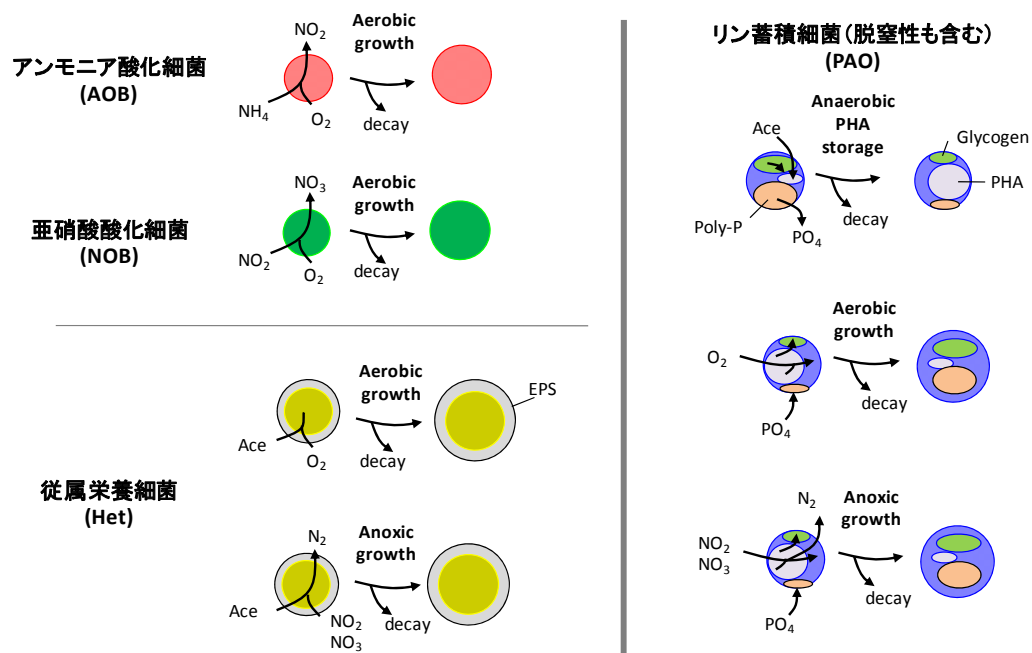


図 6. 構築した微生物反応モデル (4 菌種・20 反応)

② リアクタースケールモデル (マクロモデル) の構築

実験で使用する半回分式リアクター (SBR) の運転初期では、未成熟なグラニュールがリアクターの流出工程において外に出されてしまうため、グラニュールの個数変動が激しい。そこでリアクター内に存在する個々のグラニュールの沈降速度を計算し、グラニュールを選別するアルゴリズムを開発することで、グラニュール数変動を表現するモデルを構築した。このモデルはリアクターの運転初期を対象としている。

③ グラニュールスケールモデル (マイクロモデル) の構築

グラニュールがある程度成長すると、リアクター内の個数がほぼ一定になる一方で、グラニュールの内部構造が無視できなくなってくる。そこで、細菌を球体として表現する Individual-based model (IbM) のアルゴリズム (図 7) を用いて、SBR 中で成長するグラニュールをターゲットとしたシミュレーションモデルを構築した。

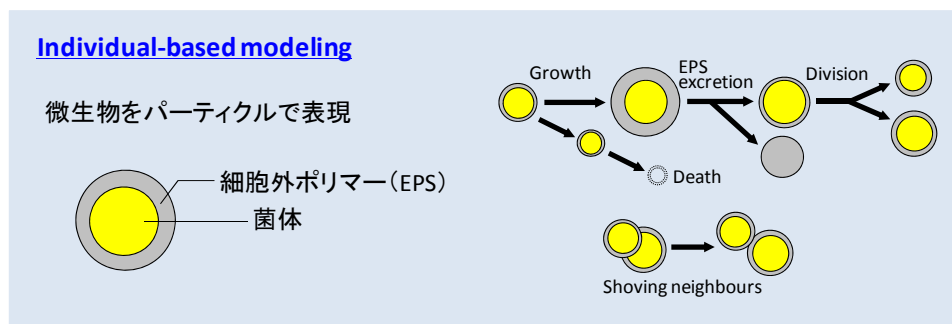
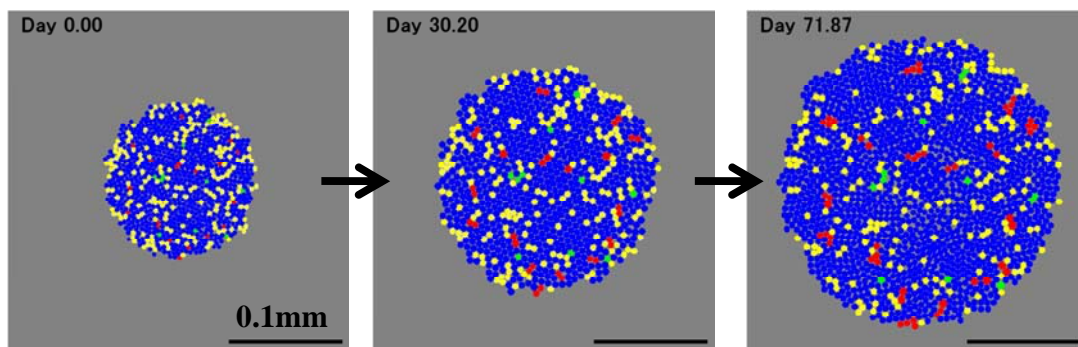


図 7. Individual-based model (IbM) のアルゴリズム (10,11)

本モデルのイメージショットを図 8 に示す。



細菌の種類: ● AOB ● NOB ● Het ● PAO

図8. グラニュールスケールモデル (マイクロモデル) のシミュレーション結果の例

図5に示した戦略に従って、マクロモデルとマイクロモデルを接続することで、任意の時刻におけるリアクターの水質データを参照することが可能になる。図9に、30日目におけるSBR1サイクルの水質データのモデルシミュレーション結果と、それに対応する実験データを示す。本図は、SBRの好気時間を110分にした場合の結果であり、実験では運転開始から約1カ月に窒素・リンの同時除去が実現した (図9の右図を参照)。一方、シミュレーション結果 (図9の左図) を見ると硝酸態窒素 (および亜硝酸態窒素) (NO_x) がサイクルの終わりで多少残留しているが、全般的には実験データを定性的に再現することができた。

実験データとのより良い一致のために、実験データとの整合性評価およびモデルの再構築を今後行っていく予定である。

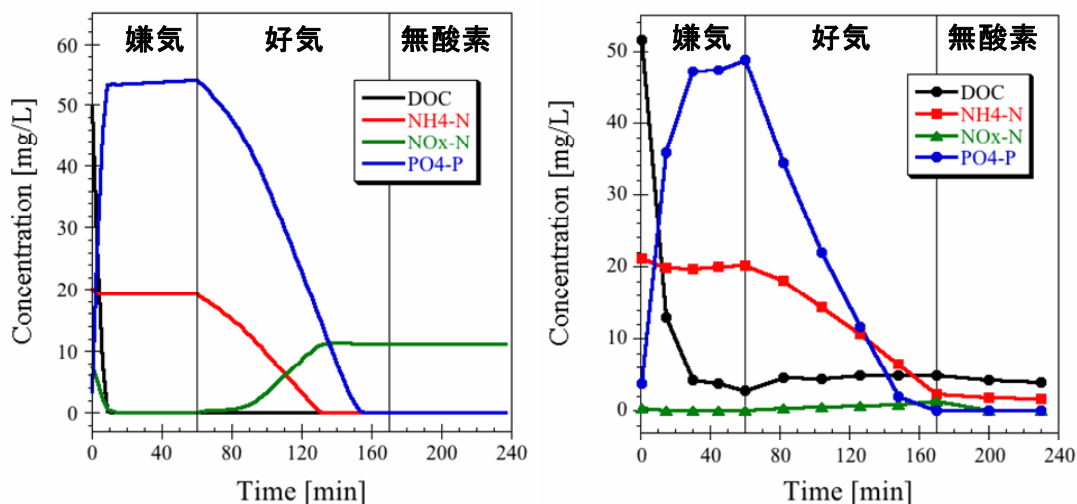


図9. 半回分式リアクター (SBR) 1サイクルの水質データ。シミュレーション結果 (左) と実験結果 (右)。実験結果は好気時間110分のリアクター (R2) の結果である。

2. 7. 5 研究成果および残された課題

(1) 実施計画に対する達成度

当初の実施計画を以下に示す。研究開発項目における研究成果は2. 8. 4で述べた通りである（項目名の最後に記載した番号に対応している）。現在のところほぼ当初の計画通りに進行しており、中間目標は達成できる見込みである。

研究開発項目	H19	H20年度				H21年度			
	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期
①アンモニア除去および窒素・リン同時除去システム内有用細菌群のパラメータ取得					→				
②微生物コミュニティ形成に関するシミュレーションモデルの構築									→
③アンモニア除去および窒素・リン同時除去型排水処理システムの運転									→
④分子生物学的手法による微生物コミュニティの実験的解明									→
⑤システム論的アプローチのアンモニア除去および窒素・リン同時除去システムへの適用									→

(2) 今後の展開

上記各研究項目（②～⑤）毎に、今後の展開について述べる。

② 微生物コミュニティ形成に関するシミュレーションモデルの構築

図5に示したモデル化戦略により、すでにマクロモデルとミクロモデルという2種類のモデルを結合させた統合モデル（リアクタースケールでのマクロな操作パラメータとグラニューールの内部構造というミクロな情報をリンク可能にする）の構築に成功している。この構築されたばかりの統合モデルの実際的な応用を見据えたブラッシュアップを行う必要がある。ここでいうブラッシュアップとは、主にモデルの計算速度、安定性の向上、汎用的使用が可能なモデルへのステップアップなどである。

③ アンモニア除去および窒素・リン同時除去型排水処理システムの運転

グラニューールを用いた窒素・リン同時除去を行う過程で、グラニューールの形成および処理性能に重要であると考えられるパラメータを人為的にコントロールしてそれが処理能力や生態構造、グラニューール形成に及ぼす影響を解析する。具体的には、グラニューール形成初期に重要であると考えられる汚泥沈降時間を制御し、グラニューール形成速度および微生物生態構造に与える影響を評価する。また、処

理性能に影響があると見出された好気時間についてもより詳細に生態構造やマイクロスケールでの活性の変化とリンクさせて排水処理能力を評価する。上記の他にも重要な因子が新たに見出された場合はそれについて評価する。

④ 分子生物学的手法による微生物コミュニティの実験的解明

実験室スケールのリアクターを用いて、微生物生態構造に影響を与えると考えられる因子を変化させたグラニュールを用いて微生物生態構造の評価を行う。微生物生態構造の評価には主に FISH 法および微小電極を適用させる。具体的には、リン蓄積細菌、アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、その他の微生物種の空間分布およびその変遷を解析する。また、微小電極を用いてグラニュール内の各種物質濃度を測定してマイクロスケールにおける活性の空間プロファイルを解析する。

⑤ システム論的アプローチのアンモニア除去および窒素・リン同時除去システムへの適用

『シミュレーションモデルの構築』（上記②）より得られた結果を、『排水処理システムの運転』（③）および『微生物コミュニティの実験的解明』（④）より得られた結果と比較・解析して、モデルの妥当性を評価する。また実験データと整合性が保たれるように、モデルの改良および再構築を行い、シミュレーションモデルの精度を高めていく。これらのステップは、本研究課題で提示するシステム論的アプローチにおいて本質的に重要な課題である。

2. 7. 6 研究体制

(1) 研究メンバー

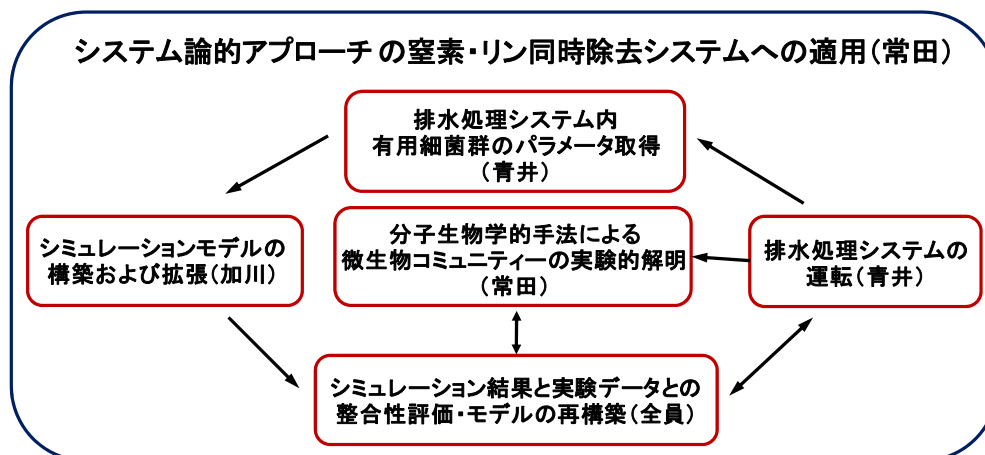
主要研究員

- ・早稲田大学 ナノ理工学研究機構 ナノプロセス研究所 研究員
(早稲田大学 理工学術院 教授) : 常田 聡

研究員

- ・早稲田大学 高等研究所 助教 : 青井 議輝
- ・早稲田大学 ナノ理工学研究機構 客員講師 (専任扱い) : 加川 友己

(2) 役割担当



2. 7. 7 参考文献

- 1) Wilderer et al., (2002) Water Res., 36, 370-393.
- 2) Seviour et al., (2003) FEMS Microbiol. Rev., 27, 99-127.
- 3) 岡部, (2005) 水環境学会誌, 28, 2-7.
- 4) 青井ら, (2005) 水環境学会誌, 28, 16-20.
- 5) Kishida et al., (2006) Water Res., 40, 2303-2310.
- 6) Henze et al., (1999) Water Sci. Tech., 39, 165-182.
- 7) Alpkvist et al., (2006) Biotechnol. Bioeng., 94, 961-979.
- 8) Xavier et al., (2007) Environ. Sci. Technol., 41, 6410-6417.
- 9) Soejima et al., (2008) Process Biochem., 43, 605-614.
- 10) Kreft et al., (2001) Microbiology, 147, 2897-2912.
- 11) Picioreanu et al., (2004) Appl. Environ. Microbiol., 70, 3024-3040.

2. 8 デザイン化微生物群を用いた高効率固定床メタン発酵の研究開発

(委託先：電力中央研究所 共同実施先：東京大学)

2. 8. 1 緒言

我が国は高度な物質生産(モノ作り)技術に支えられてきたが、将来目指す循環型社会の構築には、廃棄物の処理あるいは資源化といった環境負荷の低減技術が必須である。特に、環境関連分野においてバイオテクノロジーを利用した廃棄物、汚染物質等の生分解・処理技術などの高度化は、環境に調和した循環型産業システムの創造に欠かすことができない。既に、第3期科学技術基本計画(平成18年3月制定)において、「生物機能を活用した環境対応技術開発」が重要な研究開発課題として位置付けられる等、生物機能を活用した廃水、廃棄物の処理技術の高効率・高度化が求められている。

このような観点からメタン発酵が見直されている。従来メタン発酵は、主に下水処理場から発生する余剰汚泥の消化に適用されてきたが、近年廃棄物の処理とエネルギー回収の点から注目されている。2000年にはビール工場廃水をはじめとした各種食品工場に適用され、国内での実績は180件以上に達している。これらの技術は、含水率の高い廃棄物を対象にすることから湿式メタン発酵と呼ばれている。最近になって、特に含水率の少ない廃棄物を対象に直接メタン発酵を行う乾式メタン発酵技術が開発されたが、処理速度や安定性が湿式法に劣ると考えられている。湿式・乾式いずれの技術においても、有機物の分解からメタンの発生に至る反応は、複数の微生物の共同作業に依存しているため、処理に安定性を欠き、かつ制御手段が無いことが大きな技術的問題点である。この技術的障壁を乗り越えるため、微生物種の遺伝子レベルでの解析手法が開発され、メタン発酵における微生物集団の構成などが明らかにされつつある。しかし、現在のところ集団を構成する微生物種が明らかになったとしても、これを効果的な処理につなげる技術が無い。従って、従来のメタン発酵の技術的障害を乗り越え、処理効率の向上につなげるためには、処理に最適な機能を持つ微生物群を処理槽内に意図的に維持する技術が必要である。

微生物群の成り立ちには、微生物間の相互作用が深く関係することが知られている。例えば、メタン発酵には、加水分解・酸生成、水素生成及び酢酸化、最後にメタン生成を行う微生物が必要である。これらの化学反応を行う微生物が相互に作用し、適正な構成比で群集を形成することで系全体としてメタン生成へと反応が進む。従って、巨視的には、微生物は種々の出発物質からメタンに至る連鎖的な化学反応のエネルギーを利用して群を構成すると考えられ、微生物間の相互作用の本質は、化学物質を介した酸化・還元反応による電子の流れとして捉えることができる。これらの見地から、有用微生物群の意図的配置あるいは安定的優占化には、化学物質を介した微生物間の電子の流れを調整することが重要であると考え、発酵槽内に担体を有している固定床メタン発酵を研究対象として、電気を用いた微生物群のデザイン化技術に関して検討を行うこととした。

2. 8. 2 研究概要

バイオマス・ニッポン総合戦略における調べでは、我が国で年間発生する有機性廃棄物の総量は約3億トンに及び、その半分が焼却や埋め立て処分されているのが現状である。一方、自治体レベルでの実情では、再生可能なプラスチック類を除くと都市ゴミとしては、厨芥類、紙類、および木・竹・草類、これらに加えて家庭あるいは食品加工工場や給食センター等から発生する生ごみが主体となっている。これらの未利用食品廃棄物は年間約1760万トンにも上る。よって、本研究開発では、処理対象を生ごみを主体とする未利用有機性廃棄物とした。

従来のメタン発酵技術では、生ごみなどの有機性廃棄物に水を加えて処理に適した濃度に調整している。この時、有機物濃度が高い処理条件では運転障害が発生することが良く知られている。原因としては、微生物自身あるいは微生物集団における相互関係の崩壊につながる化学物質種の蓄積・高濃度化が考えられている。化学物質種としては、低級脂肪酸類あるいは油脂類、蛋白質の分解によるアンモニアなどの窒素化合物類などが挙げられる。メタン発酵では雑多な有機性廃棄物を処理できる点が長所であるが、それゆえ処理の不安定さにもつながることとなる。

加えて、根本的な問題として、有機物の分解からメタンの発生に至る反応が複数の微生物の共同作業である以上、処理に有効な微生物群をプロセスに導入するとともに、安定的に維持・優占化させる微生物群の制御技術が必要である。この微生物群の構成を意図的に制御する技術は、これまでに提案されていない極めて高い学術的先進性と応用的汎用性がある。なぜなら、微生物群の制御はメタン発酵に限ることなく、微生物群としての機能を利用する殆どのバイオプロセスに共通の鍵技術となり得るからである。

前述の背景をふまえて、本研究開発で取り組んだ研究概要及び研究項目は以下のとおりである。研究対象を固定床メタン発酵とし、まず、模擬廃棄物の分解に適した微生物群を取得する。取得した微生物群をデザイン化の材料とし、菌叢を保持させる担体に関して、担体の物理的及び電気化学的性質などの観点から検討し、固定床メタン発酵に適したデザイン化微生物群担体を作製する。作製したデザイン化微生物群担体に電気を流し、プロセス内に有用微生物群を安定的に維持する。

①デザイン化の素材となる有用微生物群の取得と特性・機能評価

模擬廃棄物の分解に適した有用微生物群を得る。具体的には、標準的な模擬廃棄物を設定し、これらを負荷した固定床式メタン発酵槽を連続運転することで、有用微生物群の集積を行う。また、集積した発酵槽内の微生物種（細菌、古細菌）を PCR-DGGE 法等を用いて解析する。

②取得した有用微生物群を用いたデザイン化微生物群担体の作製

デザイン化微生物群担体を作製するにあたり、用いる担体として適切なものを選択する目的で、種々の担体を用いて担体の特性が固定床式メタン発酵槽に及ぼす影響を検討する。このとき、担体上及び発酵液中の微生物群の構造を T-RFLP 法等を用いて評価する。用いる担体の選定に際しては、担体の物理的及び電気化学的性質に着目して検討を行う。選択した担体を使用し、取得した有用微生物群を用いてデザイン化微生物群担

体の作製を行う。

③デザイン化微生物群担体の電気制御・安定化技術の開発

作製した固定床メタン発酵に有効なデザイン化微生物群担体に電気を流し、その性能をメタンガス生成や有機物分解等から評価する。同時に通電時の担体上及び発酵液中の微生物群の構造を評価する。

2. 8. 3 研究目的および目標

本研究の目的は、有機物濃度が高い運転条件において固定床メタン発酵を安定化させるために、電気による微生物群のデザイン化技術を開発することである。

各項目に対する中間目標は以下のとおりである。

①デザイン化の素材となる有用微生物群の取得と特性・機能評価

デザイン化の素材として有用微生物群を取得し、それを維持するための技術面での見通しを得ること。

②取得した有用微生物群を用いたデザイン化微生物群担体の作製

デザイン化微生物群担体の作製に技術面での見通しを得ること。

③デザイン化微生物群担体の電気制御・安定化技術の開発

デザイン化担体における電気制御技術に技術面での見通しを得ること。

2. 8. 4 研究内容

①デザイン化の素材となる有用微生物群の取得と特性・機能評価

①-1 有用微生物群の取得と維持（電力中央研究所）

本研究の処理対象は、前述のように生ごみを主体とする未利用有機性廃棄物である。処理を行うための有用微生物群の取得を実施するにあたり、取り扱いやすさや実験の再現性の観点から、使用する模擬固形廃棄物（模擬生ごみ）としてドッグフードを選択した。デザイン化の素材として、模擬生ごみの分解に適した有用微生物群を取得するため、鹿島建設より供与された汚泥を種汚泥として、ドッグフードスラリーを用いて固定床式メタン発酵槽を 55℃で連続的に運転した。その結果、模擬生ごみであるドッグフードスラリーを分解してメタン発酵を行うことが可能となり、模擬固形廃棄物の分解に適した有用微生物群を取得することに成功した。取得した有用微生物群については、2 L 容量の発酵槽を使用し連続運転することによって、有用微生物群を維持することができた。

①-2 有用微生物群の特性（東京大学）

デザイン化の素材となる有用微生物群に関して、その特性を把握するために、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE）により検討を行った。その結果、微生物群を集積したことにより、細菌についてはタンパク質分解菌やセルロース分解菌として報告されている菌に近縁な細菌が特異的に見られ、古細菌（メタン菌）については水素資化性メタン菌である *Methanothermobacter* 属や *Methanobacterium* 属、また酢酸資化性

メタン菌である *Methanosarcina* 属のメタン菌が存在していることが明らかとなった。

②取得した有用微生物群を用いたデザイン化微生物群担体の作製

②-1 種々の担体を用いて固定床メタン発酵を行った際の運転結果（電力中央研究所）

デザイン化微生物群担体を作製するにあたり、用いる担体として適切なものを選択する目的で、種々の担体を用いて担体の特性が固定床式メタン発酵槽に及ぼす影響を検討した。ここでは、特性が異なる担体として、表面上が平らな親水性のガラス板（GS）及び疎水性のポリエチレン板（PES）と炭素板（グラッシーカーボン板）（CS）、3次元構造を有するガラス繊維（空隙率 25%）（GF）、ポリエチレン繊維（空隙率 98%）（PEF）、炭素繊維（空隙率 98%）（CFT）を用いた。ドッグフードスラリーを模擬廃棄物として 55°C で連続運転し、担体なし（control）または種々の担体を充填した条件で、図 1 に示すように有機物負荷速度（OLR）を徐々に増大し水理的学的滞留時間（HRT）を短くして容量 250ml の発酵槽を 73 日間運転した。その際のガス生成速度、メタン含有率、及び低級脂肪酸濃度（VFA）の経時変化を図 2 に示す。また、化学的酸素要求量（COD）を有機物濃度の指標とした際の、有機物負荷速度と化学的酸素要求量（COD）除去率及び浮遊固形分（SS）除去率との関係を図 3 に示す。その結果、担体なし（control）及びガラス板（GS）、ポリエチレン板（PES）、炭素板（グラッシーカーボン板）（CS）を充填した発酵槽では、45 日目以降ガス生成速度の低下（図 2 A）、メタン含有率の低下（図 2 B）、及び低級脂肪酸濃度の増大（図 2 C）が見られ、有機物負荷速度 3.4gCOD/L/日、水理的学的滞留時間 5.6 日の条件がメタン生成の負荷上限であった。担体なし（control）及びガラス板（GS）、ポリエチレン板（PES）、炭素板（グラッシーカーボン板）（CS）を充填した発酵槽では、それ以上の負荷（有機物負荷速度 4.6gCOD/L/日）で運転した場合、化学的酸素要求量（COD）除去率は 29-35%、浮遊固形分（SS）除去率は 22-33% となった（図 3）。以上の結果、これらの発酵槽については、有機物負荷速度 4.6gCOD/L/日以上で運転した場合、低級脂肪酸が蓄積しメタン生成速度と有機物分解速度の低下が見られることが明らかとなった。

担体としてガラス繊維（GF）を充填した発酵槽では、64 日目以降ガス生成速度の低下（図 2 A）、メタン含有率の低下（図 2 B）、及び低級脂肪酸濃度の増大（図 2 C）が見られ、負荷上限は有機物負荷速度 6.1gCOD/L/日、水理的学的滞留時間 3.1 日であった。有機物負荷速度 12.2gCOD/L/日で運転した場合、化学的酸素要求量（COD）除去効率は 41%、浮遊固形分（SS）除去率は 29% に低下した（図 3）。一方、ポリエチレン繊維（PEF）及び炭素繊維（CFT）を充填した発酵槽では、有機物負荷速度 12.2gCOD/L/日、水理的学的滞留時間 3.1 日の条件においても低級脂肪酸の蓄積は見られず（図 2 C）、安定なメタンガス生成（図 2 A、B）と有機物分解（図 3）が確認された。

以上の結果、担体として種々の板を用いた場合、発酵槽の処理能力に関して、担体を入れる効果は見られなかった。一方、種々の繊維を担体として用いた場合、板を用い

た場合と比較して、発酵槽の能力は向上し、空隙率が大きい方が発酵槽の処理能力が高いことが明らかとなった。

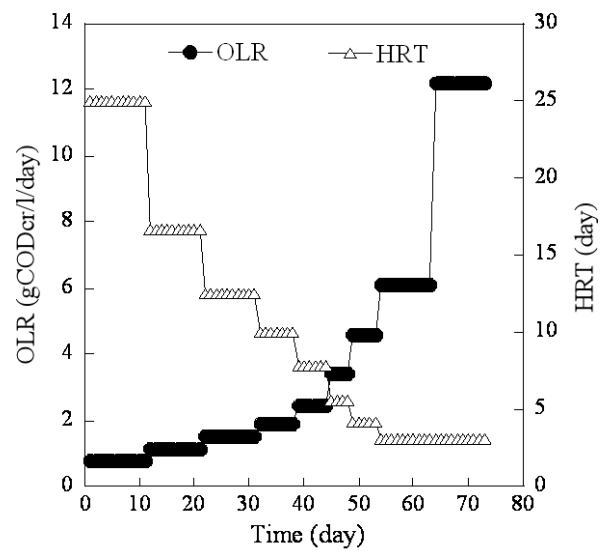


図1 有機物負荷速度 (OLR) と水理的学的滞留時間 (HRT) の経時変化

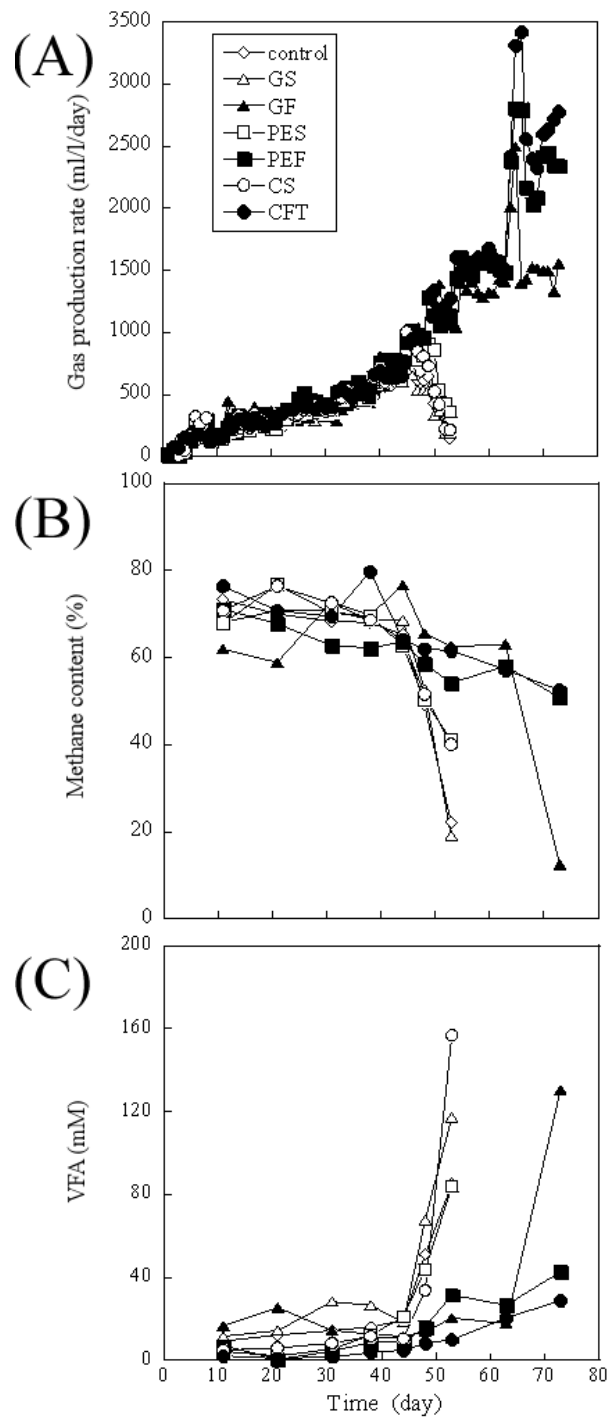


図2 (A) ガス生成速度、(B) メタン含有率、及び (C) 低級脂肪酸濃度 (VFA) の経時変化

担体なし (control)、ガラス板 (GS)、ガラス繊維 (GF)、ポリエチレン板 (PES)、ポリエチレン繊維 (PEF)、炭素板 (グラッシーカーボン板) (CS)、炭素繊維 (CFT)

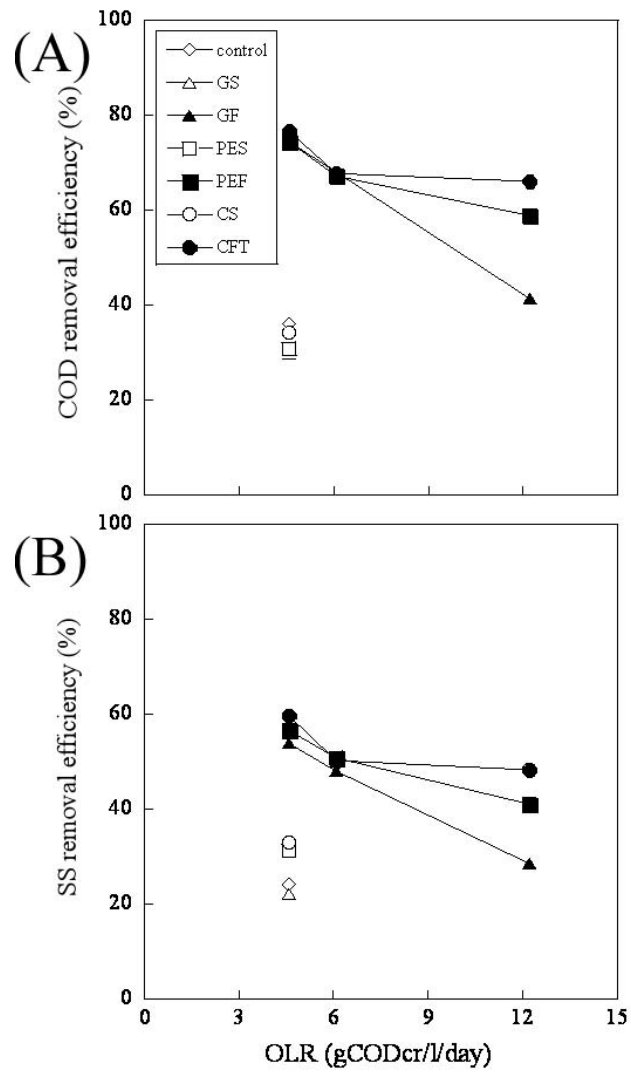


図3 有機物負荷速度（OLR）と（A）化学的酸素要求量（COD）除去率及び（B）浮遊固形分（SS）除去率との関係

担体なし（control）、ガラス板（GS）、ガラス繊維（GF）、ポリエチレン板（PES）、ポリエチレン繊維（PEF）、炭素板（グラッシーカーボン板）（CS）、炭素繊維（CFT）

②-2 微生物群集の定量的解析（電力中央研究所）

各発酵槽内の担体上と発酵液中の微生物量を評価するためにDNAの定量を行った。運転 53 日目（有機物負荷速度 4.6gCOD/L/日、水理学的滞留時間 4.2 日）における各発酵槽内の担体上と発酵液中の全菌のDNA量、メタン菌のDNA量、全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合を表 1 に示す。炭素繊維（CFT）を用いた場合、担体なし（control）及び種々の板（GS、PES、CS）を用いた時と比較して、担体上において全菌及びメタン菌（メタン生成に関与）のDNA量が 1000 倍程度多かった（表 1）。一方、5 種類の発酵槽において発酵液中のDNA量は同程度であった（表 1）。担体上と発酵液中のDNA量を比較すると、担体なし（control）及び種々の板（GS、PES、CS）を用いた場合では、担体上のDNA量は発酵液中のおおよそ 1/1000 であったが、炭素繊維（CFT）を用いた場合では担体上と発酵液中のDNA量はほぼ同程度であった（表 1）。

次に、運転 73 日目（有機物負荷速度 12.2gCOD/L/日、水理学的滞留時間 3.1 日）における各発酵槽内の担体上と発酵液中の全菌のDNA量、メタン菌のDNA量、全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合を表 2 に示す。種々の繊維（GF、PEF、CFT）を用いた場合、発酵液中の全菌及びメタン菌のDNA量と全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合については、各発酵槽間で大きな差は無かった（表 2）。担体上の全菌及びメタン菌のDNA量については、ポリエチレン繊維及び炭素繊維（PEF、CFT）を用いた場合の方がガラス繊維（GF）を用いた場合よりも比較的多く、全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合もポリエチレン繊維及び炭素繊維（PEF、CFT）の方が高かった（表 2）。担体上と発酵液中のDNA量を比較すると、ガラス繊維（GF）を用いた場合、担体上よりも発酵液中の方が全菌及びメタン菌のDNA量が多い傾向が見られたが、ポリエチレン繊維及び炭素繊維（PEF、CFT）を用いた場合、担体上のDNA量は発酵液中と同程度であり、担体上にも多くの微生物が存在していることがわかった（表 2）。全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合については、ガラス繊維（GF）を用いた場合、担体上と発酵液中でほぼ同程度であったが、ポリエチレン繊維及び炭素繊維（PEF、CFT）を用いた場合、担体上の方が割合が高く、これらの繊維を担体として用いた場合、担体上でメタン菌を多く維持できることが明らかとなった。

表1 各発酵槽内の担体上と発酵液中の全菌のDNA量、メタン菌のDNA量、
及び全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合
(運転 53 日目、有機物負荷速度 4.6gCOD/L/日、水理学的滞留時間 4.2 日)

充填した担体	画分	全菌 (コピー数/発酵槽)	メタン菌 (コピー数/発酵槽)	メタン菌/全菌 (%)
control	浮遊	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{12}$	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{11}$	6.9 ± 0.2
GS	浮遊	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{12}$	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{11}$	5.5 ± 0.2
PES	浮遊	$(6.1 \pm 0.1) \times 10^{12}$	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{11}$	2.9 ± 0.1
CS	浮遊	$(4.2 \pm 0.4) \times 10^{12}$	$(2.1 \pm 0.9) \times 10^{11}$	5.1 ± 1.9
CFT	浮遊	$(3.2 \pm 0.2) \times 10^{12}$	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^{11}$	6.8 ± 1.6
GS	付着	$(3.3 \pm 0.1) \times 10^9$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^9$	36.8 ± 0.9
PES	付着	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(2.4 \pm 0.3) \times 10^9$	22.3 ± 2.2
CS	付着	$(6.7 \pm 0.1) \times 10^9$	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^9$	27.0 ± 0.5
CFT	付着	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{12}$	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{12}$	37.4 ± 2.7

表2 各発酵槽内の担体上と発酵液中の全菌のDNA量、メタン菌のDNA量、
及び全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合
(運転 73 日目、有機物負荷速度 12.2gCOD/L/日、水理学的滞留時間 3.1 日)

充填した担体	画分	全菌 (コピー数/発酵 槽)	メタン菌 (コピー数/発酵 槽)	メタン菌/全菌 (%)
GF	浮遊	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^{12}$	$(1.7 \pm 0.4) \times 10^{11}$	7.2 ± 1.8
PEF	浮遊	$(3.5 \pm 0.4) \times 10^{12}$	$(3.2 \pm 1.3) \times 10^{11}$	9.3 ± 3.4
CFT	浮遊	$(6.2 \pm 0.7) \times 10^{12}$	$(6.7 \pm 1.6) \times 10^{11}$	11.0 ± 2.6
GF	付着	$(5.0 \pm 0.6) \times 10^{11}$	$(5.1 \pm 0.5) \times 10^{10}$	10.4 ± 1.3
PEF	付着	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{12}$	$(3.8 \pm 0.3) \times 10^{11}$	22.0 ± 2.8
CFT	付着	$(4.3 \pm 0.8) \times 10^{12}$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{12}$	35.6 ± 6.5

②-3 微生物群集の構造解析（東京大学）

各発酵槽の微生物群集の構造と微生物種を発酵槽の処理能力と合わせて評価するため、末端制限断片長多型（T-RFLP）解析およびクローン解析を行った。

運転 53 日目（有機物負荷速度 4.6gCOD/L/日、水理的滞留時間 4.2 日）における、種々の発酵槽（担体なしを含む）の発酵液画分、担体付着画分から別々に採取したゲノム DNA を元に、細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした T-RFLP 解析を行った（図 4 A、 B）。細菌の T-RFLP の結果、発酵液画分中で優占化していると考えられる微生物（群）の T-RFs（制限断片）は同様であった。しかしながら、担体付着画分においてガラス板（GS）のみが 69bp と 570bp を欠いており、他と比較して異なる群集構造であることが明らかになった（図 4 A）。また、細菌群集は発酵液中よりも担体上の方が多様性が高いことも明らかになった。一方、古細菌群集の構造は細菌と比べて単純であり、3つの T-RF が検出された（図 4 B）。これらの T-RF を同定するため、有機物負荷速度 4.6gCOD/L/day の炭素繊維（CFT）付着画分から抽出したゲノム DNA を元に、TA クローニング法により 16S rRNA 遺伝子のライブラリを作成し、得られた配列の系統学的解析を行った（表 3）。その結果、4 種類のクローンが検出され、予想される制限断片長が 186bp のクローンが主要に得られた。このクローンは酢酸資化性メタン菌である *Methanosarcina thermophila* に近縁であり、担体上のメタン菌は炭素繊維を用いた場合において、特に酢酸資化性メタン菌の割合が高いことが明らかとなった。

さらに、運転 73 日目（有機物負荷速度 12.2gCOD/L/日、水理的滞留時間 3.1 日）、滞留時間の 3 倍以上の期間、発酵槽の運転を行った状態で、種々の繊維を用いた場合の微生物群集構造の解析を行った。その結果、担体上の細菌群集は、ポリエチレン繊維（PEF）と炭素繊維（CFT）を用いた場合では類似していたが、ガラス繊維（GF）を用いた場合では傾向が大きく異なった（図 4 A）。これは、発酵液中の細菌群集についても同様であった。また、古細菌の群集構造については、ポリエチレン繊維（PEF）と炭素繊維（CFT）を用いた場合の特に担体上において、186bp の酢酸資化性メタン菌の割合が高く、ガラス繊維（GF）を用いた場合ではその割合が極めて低いことが明らかになった（図 4 B）。

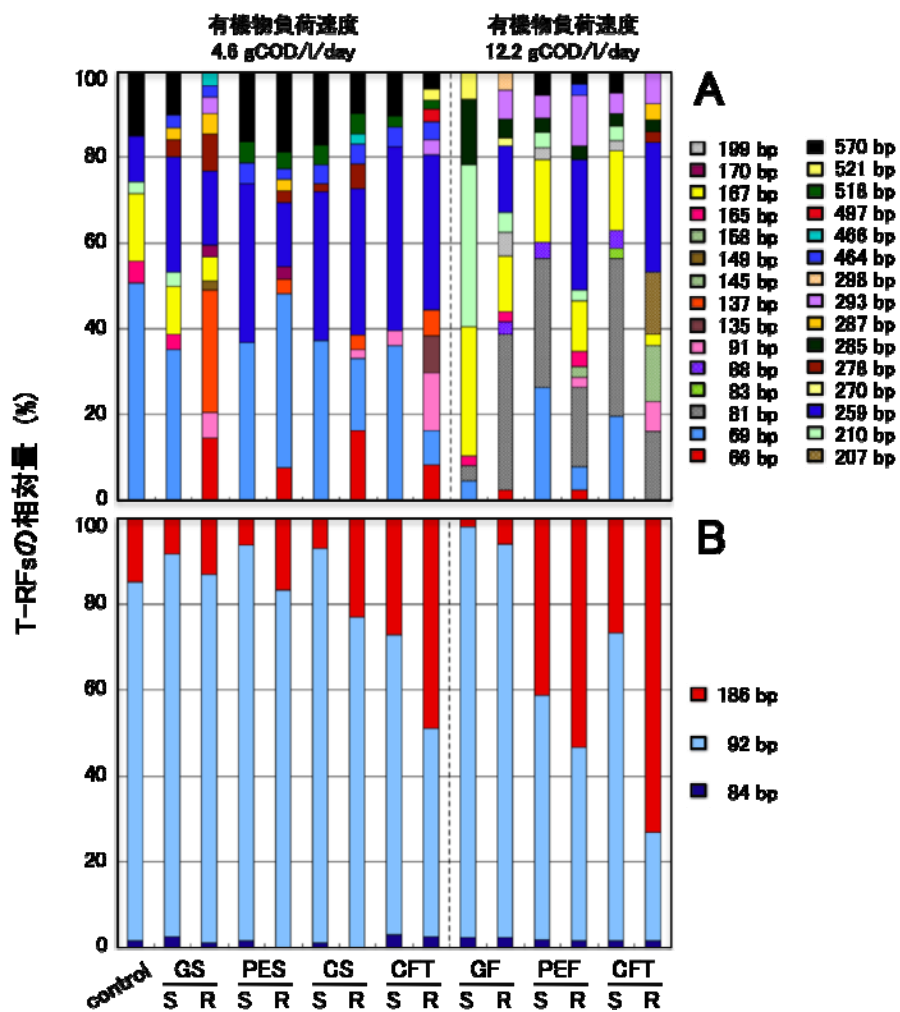


図4 T-RFLP解析による細菌 (A) および古細菌 (B) の群集構造

53日目 (4.6gCOD/L/day) の担体なし (control)、ガラス板 (GS)、ポリエチレン板 (PES)、炭素板 (CS)、炭素繊維 (CFT) と 73日目 (12.2gCOD/L/day) のガラス繊維 (GF)、ポリエチレン繊維 (PEF)、炭素繊維 (CFT) における、発酵液画分 (S) と担体付着画分 (R) の T-RFLP 結果。解析によって得られた各プロファイルの T-RFs を相対値化して示

表3 炭素繊維画分（OLR 4.6gCOD/L/day）から取得したクローンの数と系統学的特徴付け

分類単位 ^a	獲得数	制限断片長 (bp)	最も近縁な分離菌株	相同性 (%)
A1	21	186	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	98
A2	1	186	<i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140)	93
A3	4	92	<i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> (EF100758)	100
A4	4	92	<i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> (AE00066)	100
合計	30			

^a 得られたクローンの配列どうしの相同性が 99.5%以上のものは同じ分類単位とした。

②-4 担体の特性が固定床式メタン発酵槽に及ぼす影響のまとめ（電力中央研究所）

以上の結果、担体の3次元構造が発酵槽のメタン生成及び有機物分解に大きな正の効果をもたらすことが明らかとなり、その理由は、担体上の細菌及びメタン菌量の増加と特定のメタン菌の割合の増大によるものであることが示された。用いる担体の種類によっては、担体を添加した場合と担体なしの場合で発酵槽の能力は同程度となり担体添加の効果は見られず、用いる担体の種類を適切に選択することではじめて微生物群をデザイン化でき、発酵槽の処理能力を高めることができることが示された。

②-5 担体の選定と有用微生物群を用いたデザイン化微生物群担体の作製（電力中央研究所）

前述の結果より、取得した有用微生物群を用いてデザイン化微生物群担体を作製する際の理想的な担体は、担体の物理的性質という観点からは、空隙を有する3次元構造の繊維であると考えられた。次に、担体の電気化学的性質という観点から、炭素板（グラッシーカーボン板）（CS）及び炭素繊維（CFT）を用いた場合のみ溶液中を電流が流れ、担体に通電可能と判断した。しかしながら、炭素繊維（CFT）を用いた場合、わずかな電流しか流れなかったため、担体の電気化学的性質という観点からは、炭素板（グラッシーカーボン板）（CS）が適していると考えられた。従って、物理的性質と電気化学的性質の両方の観点から、理想的な担体について考えると、担体表面上が粗くなっていて表面上を微小環境でとらえた場合には空隙を有している炭素板が適していると考えた。そこで、前述の議論により選定した炭素板を用いて、取得した有用微生物群を使用してデザイン化微生物群担体の作製に取り組んだ。その結果、選定した炭素板を担体として用いた場合、有機物負荷速度 11.2gCOD/L/日の条件においても安定なメタ

ンガス生成と有機物分解が確認され、空隙を有する 3 次元構造のポリエチレン繊維 (PEF) や炭素繊維 (CFT) を用いた場合と同等の処理能力が確認でき、有用微生物群を用いたデザイン化微生物群担体の作製に成功した。

2. 8. 5 研究成果

各研究項目に関する研究成果の概略と中間目標に対する達成度を下記に記載する。

①デザイン化の素材となる有用微生物群の取得と特性・機能評価

模擬固形廃棄物(模擬生ごみ)としてドッグフードを用い、高濃度固形廃棄物の分解に適した有用微生物群を取得し、その維持を可能とした。よって、デザイン化の素材として有用微生物群を取得し、それを維持するための技術面での見通しが得られ、中間目標を達成することができた。

②取得した有用微生物群を用いたデザイン化微生物群担体の作製

種々の担体を用いて担体の特性が固定床式メタン発酵槽に及ぼす影響を検討した結果、担体の3次元構造が発酵槽のメタン生成及び有機物分解に大きな正の効果をもたらすことが明らかとなり、その理由は、担体上の細菌及びメタン菌量の増加と特定のメタン菌の割合の増大によるものであることが示された。この結果から、取得した有用微生物群を用いてデザイン化微生物群担体を作製する際の理想的な担体は、担体の物理的性質という観点からは、空隙を有する3次元構造の繊維であると考えられた。また、担体の電気化学的性質という観点からは、電流が流れやすい炭素板が適していると考えられた。これらのことを元に、担体表面上が粗くなっている炭素板を用いる担体として選定し、①により取得した有用微生物群を使用してデザイン化微生物群担体の作製に取り組んだ結果、デザイン化微生物群担体の作製に成功した。よって、デザイン化微生物群担体の作製に技術面での見通しが得られ、中間目標を達成することができた。

2. 8. 6 研究体制

【 委 託 】

財団法人 電力中央研究所 環境科学研
究所 バイオテクノロジー領域リーダー

【 共 同 実 施 】

国立大学法人 東京大学
大学院農学生命科学研究科 五十嵐教授

固定床メタン発酵に係る微生物群集解
析について共同実施

2. 9 嫌気性微生物群のデザイン化による芳香族塩素化合物の嫌気性完全分解技術の開発

(委託先：名古屋大学 再委託先：基礎地盤コンサルタンツ株式会社)

2. 9. 1 緒言

地下地盤（土壌・地下水）の汚染域が鉛直方向・水平方向に大きく広がる場合や深層に至る場合には、広範囲に大量の土砂および地下水の浄化が必要になるため、従来の物理化学的処理では対応できないことから、微生物を用いた原位置浄化技術(バイオレメディエーション技術)の適用が期待されている。これまで開発されてきたバイオレメディエーション技術は、主に掘削した土壌に対する好氣的条件での処理であり、地中の嫌氣的な条件下での原位置浄化技術は、トリクロロエチレンの脱塩素化の様な脂肪族塩素化合物に限られているのが現状である。しかし、不法投棄による汚染地では、ポリ塩化ビフェニルやダイオキシン類など難分解性の芳香族塩素化合物が存在する場合が多いことが知られている。芳香族塩素化合物の分解浄化の際には、嫌氣的条件での脱塩素化反応を行った後に好氣的条件にして芳香環の酸化分解反応を行う2段階の反応が考えられてきたが、地下地盤を嫌気反応に適した条件にした後で好氣的条件に変換するのは多大なエネルギーがかかることから、実際には殆ど行われていない。しかし近年、嫌気条件下でも芳香環を酸化分解できる微生物が発見されてきた。このことは、嫌氣的条件のまま芳香族塩素化合物を脱塩素化して更に酸化分解できる可能性を示している。嫌氣的条件のまま完全分解することができれば、嫌気と好気を切り替える方式に必要な反応容積およびコストや投入エネルギーを大きく低減化した高効率の浄化系を構築できることが期待される。本研究グループは、これまでに既に多孔性無機資材を用いて多様な脱塩素活性を持つ嫌気微生物群を維持培養する技術を開発するとともに、PCB等の芳香族塩素化合物を脱塩素する微生物群を獲得するなど準備を進めてきた。

そこで本研究プロジェクトでは、多孔性無機資材を用いた微生物培養技術を元に、還元的脱塩素化を行う微生物群と嫌氣的酸化を行う微生物群の両者を共存させる反応系をデザイン化し、嫌氣的な条件のまま芳香族塩素化合物の完全分解・無害化を達成するシステムを構築することを目的とした。

2. 9. 2 研究概要

(1) 本研究の環境浄化研究での位置付けと研究の動機

我が国では、土壌地下水に対する環境基準が1990年代になるまで設定されなかったことから、産業廃棄物や化学廃棄物の土壌埋め立て処分が行われてきた。多くの事業所で、その事業所敷地内に化学廃棄物を埋め立てた例があり、また各農家で使われた DDT 等の芳香族塩素系農薬も、環境省および農林水産省の指示によって地中埋め立て処分が行われ、現在でも埋設農薬として残留し問題となっている。また、

中部地方には多くの民間産業廃棄物処分場があるが、以前には管理の良くない処分場もあり、その様な場所では地中で化学物質同士が反応し、場合によっては発火・不完全燃焼を起こし、地中でポリ塩化ビフェニルやダイオキシン等の芳香族塩素化合物類を発生した例もあって問題となっている。このように地下地盤（土壌・地下水）の汚染域が鉛直方向・水平方向に大きく広がる場合や深層に至る場合には、広範囲に大量の土砂および地下水の浄化が必要になるため、従来の物理化学的処理では対応できないことから、微生物を用いた原位置浄化技術の適用が期待されている。これまで開発されてきたバイオレメディエーション技術は主に好気的条件下での処理であり、嫌気性条件下でのバイオレメディエーション技術は脂肪族塩素系溶媒地中の脱塩素化反応に限られているのが現状である。嫌気的条件下でダイオキシン類など難分解性の芳香族塩素化合物を微生物群によって分解する嫌気的微生物浄化（嫌気的バイオレメディエーション）技術の開発は、殆ど進んでいない。芳香族塩素化合物の微生物分解には、還元的脱塩素反応の後、芳香環の酸化分解が必要である。それを原位置で実施するためには、まず地下地盤を嫌気条件にして脱塩素反応を進めた後、次に好気的条件下として酸化分解を行わなければならない、非現実的な技術とされ実用化は見送られてきた。しかし近年の嫌気性微生物の研究から、嫌気性条件下で芳香環の酸化分解を行う微生物が見いだされてきた。このことは、嫌気条件下で脱塩素反応と酸化分解反応の両方を起こすことができる可能性を示唆している。そこで、脱塩素反応を行う微生物と嫌気的酸化分解を行う微生物をデザイン化することによって、嫌気性そのまま芳香族塩素化合物を分解する微生物浄化システムを着想するに至った。嫌気的条件下のまま完全分解することができれば、嫌気と好気を切り替える方式に必要な反応容積およびコストや投入エネルギーを大きく低減化した高効率の浄化系を構築できることが期待される。

（2）類似研究、先行研究、先行技術

これまでに開発されてきた嫌気的バイオレメディエーション技術は、主にテトラクロロエチレンやトリクロロエチレン等の脂肪族塩素系化合物を対象とし、*Dehalococcoides* 属細菌等の嫌気性細菌によって還元的脱塩素反応を行い、無害なエチレンまで脱塩素することによって浄化を達成するものである。この場合、*Dehalococcoides* 属細菌単独でエチレンまで脱塩素できるため、自然環境下に存在する単独嫌気微生物の脱塩素活性を電子供与体の添加によって活性化させることによって浄化を促進・達成することができる。しかし、本研究で対象とするクロロフェノール類やポリ塩化ビフェニル等の芳香族塩素化合物の場合は、塩素の置換位置によって多様な異性体（または同族体）が存在すること、また全ての異性体（または同族体）を脱塩素化できたとしても、その反応の結果生成する芳香族化合物はまだなお有害な化学物質であり、浄化のためには芳香環の嫌気的酸化分解反応が更に必要であることという二つの大きな課題点が存在する。一般に微生物反応（酵素

反応)は、その基質特異性の高さが特徴であることから、多様な芳香族塩素化合物の脱塩素化には複数の異なる脱塩素微生物が必要であると考えられる (Sower らの Sixth International Conference Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, Monterey, 2008 における議論では、PCB 脱塩素には最低 3 種の微生物が必要とされる。)

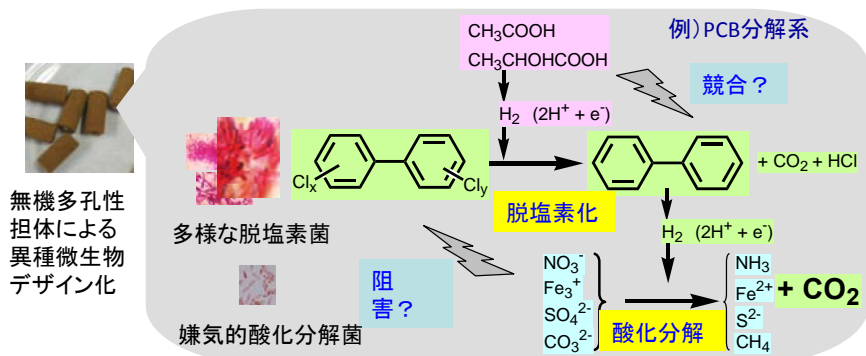
一方、脱塩素微生物 (*Dehalococcoides* 属細菌、*Desulfitobacterium* 属細菌等)には、芳香環の嫌氣的酸化分解の能力の報告はない。従って、芳香族塩素化合物の完全分解には、脱塩素微生物に加えて、嫌氣的酸化分解微生物も必要となる。これまで、脱塩素反応後の芳香環の酸化分解は好氣的な条件で期待される反応とされてきた (例えば Furukawa, Biosci. Biotech. Biochem. 70:2335-48, 2006)。これまでに微生物を用いた芳香族塩素化合物の分解システムの開発研究例でも、嫌氣的脱塩素反応の後に好氣的酸化分解反応を組み合わせるものばかりである (例えば、Ehlers と Rose, Water Environ. Res. 78;701-708, 2006)。

しかし、最近になって嫌氣的条件下で種々の芳香環の開裂反応が報告される様になってきた (例えば、Johnson ら Engineering Geology, 70:343-349, 2003)。これらの報告は、嫌氣条件のまま芳香族塩素化合物を完全分解する可能性を示唆するものである。

(3) 研究の動機とねらい

これまでに本研究グループは、ダイオキシン類の一つの化合物であるポリ塩化ビフェニルを対象に、多様な同族体を還元的脱塩素反応する微生物群を、多孔性の無機資材を用いることによって獲得維持できることを見いだしている (片山・馬場、特開 2006-320249)。また同様の方法を用いて、クロロフェノール類の脱塩素化活性と、フェノールの嫌氣的酸化分解活性を持つ土壌を見だし、集積して活性を高めつつある。この様に、本研究グループは、この開発研究で最も時間のかかることが予想される有用微生物群の集積維持の準備ができていたことから、本研究開発の遂行が可能と判断し、研究提案をするに至った。

本研究開発では、この多孔性無機資材を用いた微生物培養技術を元に、還元的脱塩素化を行う微生物群と嫌氣的酸化を行う微生物群の両者を共存させる反応系をデザイン化し、嫌氣的な条件のままクロロフェノールおよびポリ塩化ビフェニル等の芳香族塩素化合物の完全分解・無害化を達成することを目的とする。これは、地下地盤や底質の様な嫌氣環境を汚染する芳香族塩素化合物を、原位置で嫌氣的条件のまま微生物浄化することを世界で初めて可能にするものであり、得られる技術的成果は世界中の汚染地での利用によって環境改善に役立つものと期待される。



還元的脱塩素菌+嫌氣性酸化分解菌の無機多孔性資材上へのデザイン化による芳香族塩素化合物の嫌氣完全分解系の構築

2. 9. 3 研究目的および目標

還元的脱塩素微生物と嫌氣性芳香族酸化分解菌を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化することによって、芳香族塩素化合物の嫌氣条件下での完全分解技術を構築する（上図）。比較的親水性のハロゲン化フェノール類を対象とした完全分解系の構築を中間目標とし、以下の4つのサブテーマによるアプローチを密接に関係づけながら研究を遂行する。

(1) サブテーマ1：嫌氣性微生物群の取得維持と特性評価

①還元的脱塩素微生物群の取得と特性評価

塩素化フェノール、フサライド、ポリ塩化ビフェニルを嫌氣条件下で脱塩素する微生物群の集積・維持を行う。集積微生物群の増殖および脱塩素活性に対する各種電子供与体および各種電子受容体の影響を明らかにする。代謝産物を明らかにし、代謝経路を決定する。重要な必要条件を明らかにして、脱塩素細菌の単離を継続的に試みる。中間目標として、塩素化フェノール、フサライド、ポリ塩化ビフェニルそれぞれの脱塩素微生物群の安定集積物を得ることを目標とする。

②嫌氣的酸化微生物群の取得

一方で、フェノールおよびビフェニルの嫌氣的酸化分解微生物を集積する。フェノールの嫌氣酸化分解菌の安定集積物を得ることを中間目標とする。更に、集積培養微生物群から、その反応を担う有用微生物を単離する試みを継続的に行う。

③微生物の安全性に関する研究

また、得られた集積微生物の群集構造を、16S-rRNA 遺伝子の PCR-DGGE 解析等によって明らかにする。集積微生物群を対象に、ヒト病原性などを持つ有害微生物の有無を調べる簡易解析法を開発する。

(2) サブテーマ2：微生物担体の開発

嫌氣性微生物活性を高める無機質多孔体の特性を明らかにし、その設計・製造を行う。脱塩素化微生物群および嫌氣的酸化分解微生物群の活性を高める資材の物理

化学特性を明らかにすることを中間目標とする。サブテーマ1で単離微生物が得られれば、順次、単離した脱塩素微生物および嫌氣的酸化分解微生物に適した担体の開発を進める。

(3) サブテーマ3：嫌気性微生物群集の担体上へのデザイン化方法の開発

上記のサブテーマ1で得られた微生物群をサブテーマ2で開発した無機質多孔体に担持し、脱塩素微生物群と嫌氣的酸化分解菌を組み合わせた嫌気微生物群の完全分解活性の大小を試験する。塩素化フェノールを対象とした完全分解系の構築を中間目標とする。単離菌が得られれば、単離菌でのデザイン化実験へと移行する。ここでの完全分解特性の評価には、バッチシステムを用いる。分解に伴う微生物群の増殖特性を明らかにする。また、得られた成果を、サブテーマ4での流れ場における完全分解システム開発および再委託先の基礎地盤コンサルタンツが開発するモデルのプログラム設計仕様（必要な反応条件と計算機能）に反映する。

(4) サブテーマ4：デザイン化担体を用いた嫌氣的完全分解システムの開発

上記サブテーマ3)で得られた有望な微生物（群集、単離菌）の組み合わせをシステム化し、完全分解系の設計を行う。ハロゲン化フェノールの完全分解系の流れ場で実現することを中間目標とする。得られた成果を、サブテーマ4の再委託先の基礎地盤コンサルタンツが開発するモデルのプログラム設計仕様（必要な反応条件と計算機能）に反映する。

(5) サブテーマ4（その2）：芳香族塩素化合物の輸送と微生物分解のシミュレーション

中間目標として、基礎地盤コンサルタンツ株式会社には、ハロゲン化フェノールを対象とした実場面で想定される嫌氣的完全分解システムにおける芳香族塩素化合物の輸送と微生物分解のシミュレーションを再委託する。

以上により、比較的親水性の芳香族塩素化合物を対象に、嫌気性脱塩素菌と嫌気性芳香族酸化分解菌を選抜し、無機担体上へのデザイン化による嫌気性での芳香族塩素化合物完全分解を可能にすること、デザイン化微生物群の活性を高める条件を明らかにし、透過性反応壁として必要な活性（ $50\mu\text{M}$ のペンタクロロフェノールを30日以内に完全分解）を、従来技術の50%コンパクト化をした反応場で達成することを3年間の中間目標とする。

2. 9. 4 研究内容

(1) 嫌気性微生物群の取得維持と特性評価

芳香族塩素化合物を完全分解系のデザイン化に必要な生理学的に異なる還元的脱塩素微生物（群）および嫌氣的酸化分解微生物(群)を集積あるいは単離を行った。集積には、耐圧嫌気ビンを用いた回分培養物を継代培養することによって行った。嫌気微生物培養系に残留する芳香族化合物および生成する代謝産物は、有機溶媒抽

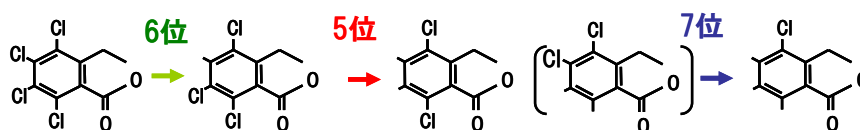
出後、GC-MS で定性・定量した。ただし、ポリ塩化ビフェニルの通常定量分析には、高感度の GC-ECD を用いた。電子供与体および電子受容体の培養物中の濃度は、それぞれ高速液体クロマトグラフィーおよびイオンクロマトグラフィーで測定した。

①還元的脱塩素微生物群の取得と特性評価

ペンタクロロフェノール、2,4,6-トリクロロフェノール、4,5,6,7-テトラクロロフタリド、ポリ塩化ビフェニル、1,2,3-トリクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシンを脱塩素する微生物群をそれぞれ集積し、中間目標である脱塩素微生物群の集積またはその維持に成功した。

ペンタクロロフェノールの脱塩素集積微生物群は、乳酸を炭素源としてペンタクロロフェノールをフェノールまで脱塩素する新規活性を有したが、成育因子として単離源である土壌を必要とした。高濃度硫酸イオンによって脱塩素活性が阻害されることが明らかとなった。

ポリ塩化ビフェニル(カネクロール 300/400)の脱塩素微生物群の土壌を含まない液体培養集積系の構築に成功した。また、4,5,6,7-テトラクロロフタリドを芳香族塩素化合物として用い、脱塩素反応(下記)を担う新規 *Dehalobacter* 属細菌の関与を特定するとともに、単離に

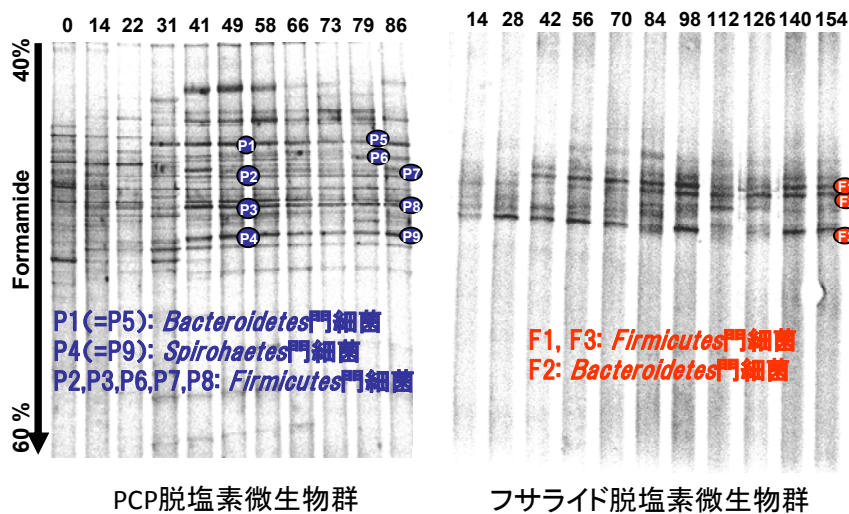


嫌気性集積微生物によるフサライドの脱塩素反応

成功した。これは、*Dehalobacter* 属が芳香族塩素化合物を脱塩素する世界で初めての単離例である。*Dehalobacter* 属細菌は、植物防疫上、安全とされ、その利用が期待される。

②嫌氣的酸化微生物群の取得

フェノール、クロロフェノール、ビフェニル嫌氣的酸化分解を行うことが出来る微生物群を、硫酸還元条件および鉄還元条件で集積した。フェノール分解微生物群完全分解していることを、電子供与体と電子受容体の物質収支から明らかにした。中間目標としたフェノールを嫌氣的酸化分解する微生物群の土粒子を含まない集積系(硫酸還元系、鉄還元系)の構築に成功した。さらに、 $[^{14}\text{C-ring(U)}]$ ビフェニルを用いてある種の土壌には、二酸化炭素まで完全分解する活性があることを見いだした。



③微生物の安全性に関する研究

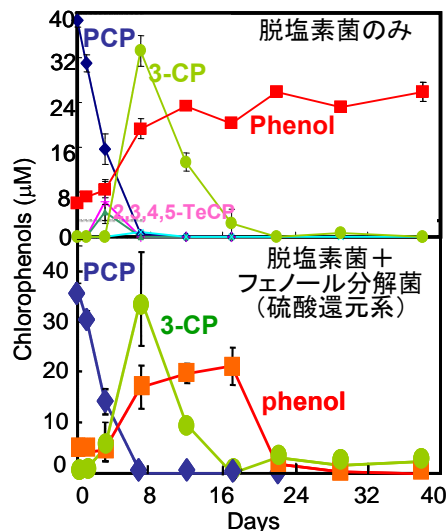
上記で得られた微生物群の群集構造を16S-rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE 法と DNA クローニング・シーケンスによって明らかにした(上図)。また、土壌微生物群集中の病原菌の簡易検出法を検討し、繰出水田土壌試料に添加した病原菌の検出に成功した。DNA マイクロアレイ法より簡便な方法として期待される。

(2) 微生物担体の開発

微生物担体として用いる無機質多孔体の空隙サイズが微生物群集構造および微生物バイオマスに対して有意な影響を与えることを明らかにした。この現象は、好气的条件および嫌气的条件いずれの条件でも起こった。サブテーマ3で用いた市販無機質多孔性担体のかさ密度や孔隙率などの物理特性を調べるとともに、その化学成分を蛍光 X 線で測定した。中間目標としたクロロフェノール分解に必要な脱塩素微生物群および嫌気性酸化分解微生物群の活性を高める担体の物理化学性質を明らかにするとともに、その合成法を考案した。

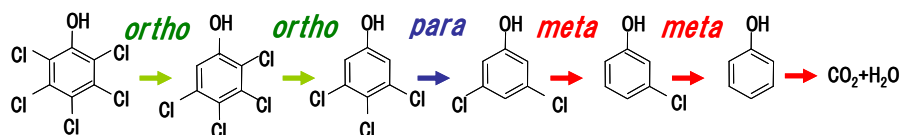
(3) 嫌気性微生物群集の担体上へのデザイン化方法の開発

サブテーマ1で得られた還元的脱塩素微生物群と嫌气的酸化分解微生物群に、殺菌土壌粒子を担体として組み合わせ、ペンタクロロフェノールを対象として嫌気性条件下での完全分解系(前ページ図)の構築(代謝経路は下に示す)に成功し、中間目標を達成した。 $[^{14}\text{C-ring(U)}]$ ペンタクロロフェノールおよび $[^{14}\text{C-ring(U)}]$ フェ



ペンタクロロフェノール(PCP)脱塩素菌群と硫酸還元系フェノール分解菌群によるPCP完全分解系の構築例

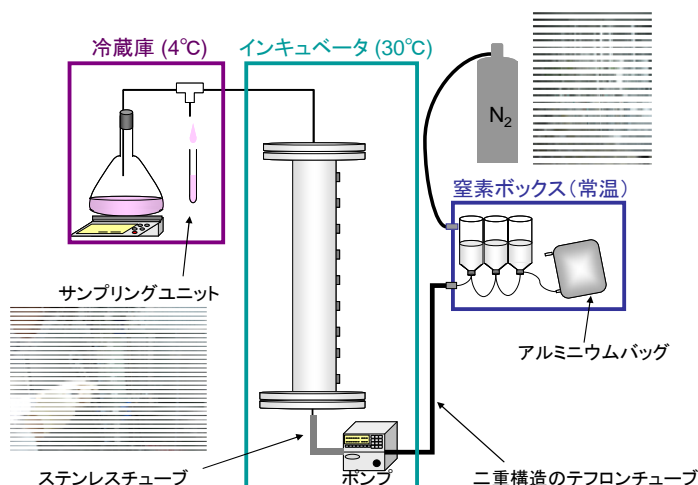
ノールからの $^{14}\text{CO}_2$ と $^{14}\text{CH}_4$ 発生によって、完全無機化を確認した。担体の性質が、その分解活性に影響した。この成果をサブテーマ2の担体設計にフィードバックした。



還元的PCP脱塩素菌群と嫌気フェノール酸化分解菌群の組合せによるPCP完全分解推定経路

(4) デザイン化担体を用いた嫌氣的完全分解システムの開発

ペントクロロフェノールを対象とした脱塩素化微生物群と、脱塩素化代謝産物であるフェノールを対象とした酸化分解微生物群を詰めたカラムをそれぞれ準備し、流動場での浄化試験を行った。脱塩素化系では、塩素収支を明らかにし 90%以上のPCP 脱塩素化率の達成に成功した。フェノール酸化分解系では酸化分解率 100%を達成することに成功した。



嫌気カラム(一次元流動場)システム

脱塩素化微生物群と嫌気酸化分解微生物をそれぞれ保持した2つのカラムをつないで、嫌気性条件の流れ場における二酸化炭素までの完全分解に成功した。従来のコンセプトである脱塩素化微生物群と好気性芳香族酸化微生物群の組合せ技術(嫌気+好気微生物技術、非実用的技術)と比較し、同容積の嫌気反応場(2カラムシステム)で原位置で実施可能な高い反応速度(滞留時間16日程度)で完全分解を達成した。さらに、両微生物群を一カ所に共存させる1カラムシステムを設計し(2カラムシステムの50%コンパクト化反応場)で、滞留時間26日で85%分解を達成した。

(5) サブテーマ4(その2): 芳香族塩素化合物の輸送と微生物分解のシミュレーション

複数の嫌気性微生物分解反応共存条件下の反応モデルを構築し、非流動場を想定したシミュレーションプログラムの開発を行った。サブテーマ3のペントクロロ

フェノール完全分解系を良く表すシミュレーションに成功し、中間目標を達成した。さらに、実汚染サイトにおける芳香族塩素化合物の脱塩素化反応のプロセスをより高い精度で追跡できるように、反応モデル改良作業、対応プログラムの開発を行うとともに、プログラムテスト作業を実施している。

2. 9. 5 研究成果および残された課題

以上のように、中間目標であるハロゲン化フェノールの流動場における完全分解系の構築は、ほぼ達成された。以下に残された課題とプロジェクト3年終了時の中間目標に対する現時点（3年目初旬）における達成度を示す。

(1) 嫌気性微生物群の取得維持と特性評価

①還元的脱塩素微生物群の取得と特性評価

ペンタクロロフェノール、2,4,6-トリクロロフェノール、4,5,6,7-テトラクロロフタリド、ポリ塩化ビフェニル、1,2,3-トリクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシンを脱塩素する微生物群をそれぞれ集積し、中間目標である脱塩素微生物群の集積・維持に成功するとともに、*Dehalobacter* 属細菌の単離に成功した（達成度：100%）。

②嫌氣的酸化微生物群の取得

中間目標としたフェノールを嫌氣的酸化分解する微生物群の土粒子を含まない集積系（硫酸還元系、鉄還元系）の構築に成功した。今後、PCB 脱塩素微生物群に組み合わせるためのビフェニル嫌気分解菌の集積を進めている。（達成率：90%）

③微生物の安全性に関する研究

上記で得られた、集積微生物群の 16S-rRNA 遺伝子に基づく群集構造を明らかにした。

また、微生物群集中の病原菌の簡易検出法による、繰出水田土壌試料に添加した病原菌の検出に成功した（達成度：100%）。

(2) 微生物担体の開発

中間目標としたクロロフェノール分解に必要な脱塩素微生物群および嫌気性酸化分解微生物群の活性を高める担体の物理化学性質を明らかにし、その性質を有する無機質多孔担体の設計・合成方法を明らかにすることに成功した。現在、設計・合成した担体での確認試験を進めている（達成度：90%）。

(3) 嫌気性微生物群集の担体上へのデザイン化方法の開発

サブテーマ1で得られた還元的脱塩素微生物群と嫌氣的酸化分解微生物群を、殺菌土壌粒子を担体として組み合わせ、ペンタクロロフェノールを対象として嫌気性条件下での完全分解系の構築に成功した。また、高効率化に必要な因子を調べ、原位置の透過性反応浄化壁設計に必要な「ペンタクロロフェノール（50 μM）の30日以内の完全分解」を、世界に先駆けて達成した（実験では24日間で完全分解）。（達成率：100%）

(4) デザイン化担体を用いた嫌氣的完全分解システムの開発

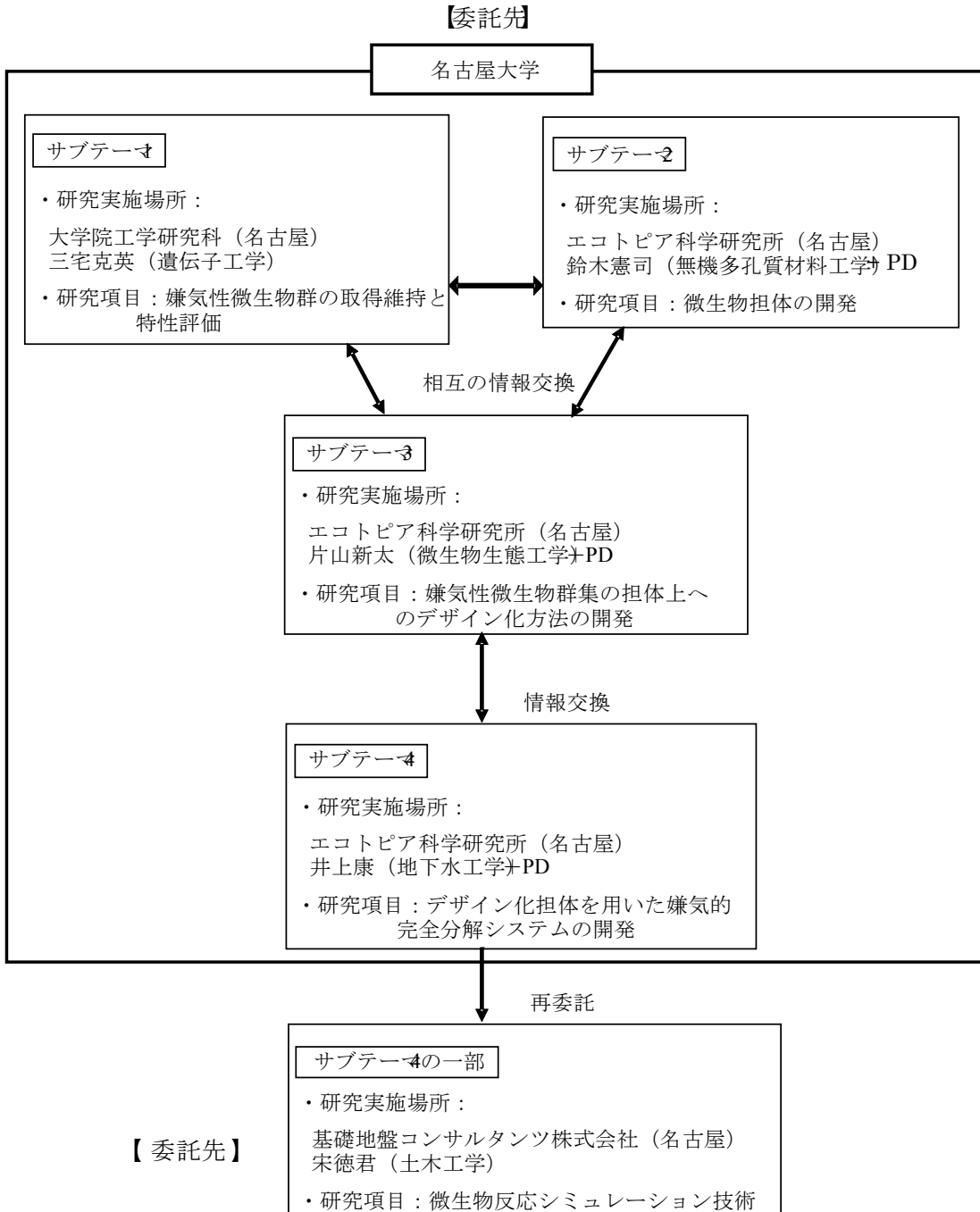
ペンタクロロフェノールを対象とし、脱塩素化微生物群と嫌気酸化分解微生物群を担体に保持した流動場での浄化試験で、脱塩素化および嫌気酸化分解にそれぞれ成功し、それらを組み合わせた二酸化炭素まで分解する嫌氣的完全分解システムを構築した。脱塩素化微生物群と嫌気酸化分解微生物群を別々のカラムに保持した 2 カラムシステムで、高い分解速度を達成するとともに、両微生物群を共存させる 1 カラムシステム (50%コンパクト化反応場) でも、滞留時間 26 日で 85%分解を達成した。現在、更なる活性向上のための試験を進めている(達成率 90%)。

(5) 嫌気性微生物群集の担体上へのデザイン化方法の開発

複数の嫌気性微生物分解反応共存条件下の反応モデルを構築し、非流動場を想定したシミュレーションプログラムの開発に成功し、中間目標をほぼ達成した。(達成率 90%)

2. 9. 6 研究体制

(1) 研究体制スキーム



IV. 実用化の見通しについて

研究開発項目毎の実用化の見通しは以下の通りである。

2. 1 内生呼吸低減菌等の有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発

(株式会社日立プラントテクノロジー)

1 実用化の見通し

日立プラントテクノロジーではこれまで包括固定化担体を 7,000m³ 生産し、下水処理場や産業廃水処理場に納入し稼働している。硝化細菌を固定化した包括固定化担体で、古いものでは 18 年間稼働している。今回、内生呼吸低減菌を見出し、また亜硝酸型硝化の手法を見出した。これらの技術(内生呼吸低減担体、亜硝酸型担体)はこれまで納入し稼働している施設での活用が可能であり、曝気量を大幅に低減できる。22, 23 年度での担体の寿命(活性、物性の寿命)試験とともに実証試験を踏まえ、実用化できると判断する。

本技術は食品廃水、機械廃水、化学廃水、電子部品廃水、発酵廃水、下水、電力廃水など生物処理が可能なあらゆる廃水に利用でき、曝気エネルギー低減を達成できる見通しである。具体的には新設、既設に対応でき、特に既設設備については現在稼働している担体投入型循環変法の硝化槽に本開発担体を投入し、担体引き抜きアルカリ処理装置を備えれば曝気エネルギー低減を達成できる。(図 1)

機能化技術[1]

包括固定化担体を用いたコンタミ防止維持システム開発

担体の表面をアルカリ処理しコンタミによるバイオフィルムの形成防止

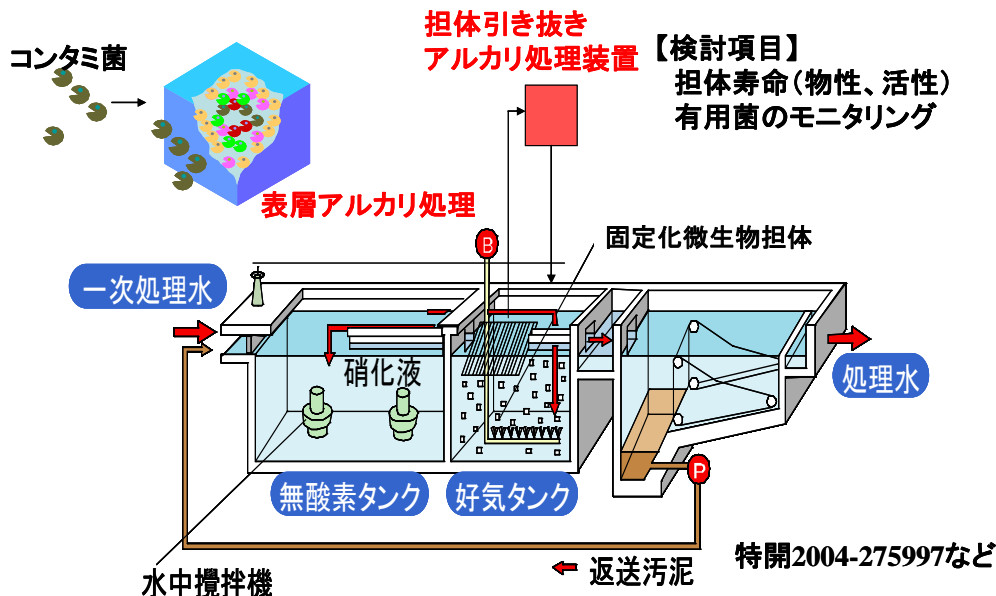


図 1 包括固定化担体を用いた実用化概念図

2. 波及効果

2. 2 内生呼吸低減菌等の有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発

(株式会社日立プラントテクノロジー)

本開発技術は国内の下水や民間産業廃水での利用は勿論、東南アジア、中東、欧米での既設廃水処理や新設設備での活用が可能である。また、今回見出した内生呼吸低減菌はフリーの細胞としての活用も考えられ、菌株の販売が可能である。これまで水処理業界では各種菌株販売ベンチャーを起業し、汚泥低減菌、硝化菌、フェノール分解菌など販売してきたが一大産業になった例はない。今回開発された曝気量低減できる内生呼吸低減菌は、今後実証を積み重ねることにより、幅広い業種の廃水処理に販売できるものと期待できる。これにより環境ビジネスでの有用菌培養液販売のビジネスを活性化できる。

3. 今後の展開

3. 2 内生呼吸低減菌等の有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発

(株式会社日立プラントテクノロジー)

内生呼吸低減菌利用の実用化、亜硝酸型硝化反応の実用化を達成し、最終目標を達成するために、今後、以下の研究開発を22年度、23年度に展開する。

- (1) 曝気低減効果の大きい亜硝酸型硝化反応を軸に、今回報告した亜硝酸型包括固定化担体での活性の寿命、物性の寿命について長期試験や加速試験で検討することにより、工業化可能なレベルまで技術確立する。

メタン発酵チーム、アナモックスチームらと連携し、亜硝酸型反応と内生呼吸低減菌利用技術を活用したシステムとこれらのプロジェクト技術を統合することにより、最終目標である曝気エネルギー1/3を達成する。

2. 2 厨房廃水処理用油脂分解バイオフィームの高機能化・安定化のための微生物製剤導入技術の研究開発事業

(委託先 国立大学法人 名古屋工業大学 共同実施先 愛知県産業技術研究所)

1 実用化の見通し

現段階でも本プロジェクトで開発した新規微生物 SL1B1 および SL1B2 による実際のグリーストラップ内での油脂分解効率が非常に高く実用レベルにあることが、実証試験をもって証明された。実証試験を実施している大学生協のグリーストラップは、微生物製剤を導入しないと、ノルマルヘキサン値として 3000~10000mg/L の油分を排出しているのに対し、新規開発の微生物製剤を導入したところ、60~70mg/L にまで低下し、本製剤の有効性が証明された。

また本プロジェクトの枠外で、導入微生物の活性を *in situ* で飛躍的に高める新技術を確立した。これによって本プロジェクトで開発した新規微生物による油脂分解速度が飛躍的に向上し、グリーストラップに浮いていた油が見えなくなり、代わりに発酵による発泡が生じるなど、劇的な浄化効果を示した。開発した微生物製剤を導入せずに活性化技術だけを適用しても油除去効果は見られなかったことから、開発した微生物製剤の効果が実証された。よって、バイオフィームによるグリーストラップ浄化技術はブレイクスルーに至ったと評価できる。さらに、NEDO プロジェクトマネージャーからも本微生物製剤は既に実用化可能なレベルにあるとの高い評価を得た。既に実用化を想定して、愛知県内の中小企業とコンソーシウムを形成し、本プロジェクト終了後 5 年間の事業計画の立案作業に入っている。

2 波及効果

外食産業店舗数は国内で約 80 万件であり、ホテル・食材センターを含めると約 100 万件であると言われている。これらのグリーストラップが引き起こす悪臭や配管詰まり、そのメンテナンスにかかる人的負担や清掃回収コストは深刻な問題であり、本技術における市場ニーズは極めて高いと言える。また、人体や環境に影響を与えない微生物を用いる浄化技術なので、より期待度は大きい。さらに、グリーストラップ以外にも、油分解技術として食品工場のような大型油処理施設など、他分野への事業拡大も想定される。また、ボトムアップ型バイオフィーム技術の汎用性として微生物洗剤、種汚泥、特殊廃水処理、環境水の浄化、バイオレメディエーション、工業用微生物触媒などへの応用も想定される。

また、現在様々な企業が、グリーストラップ用の微生物製剤を販売しているが、内容物や組成、混入している微生物の生態や分解能力の評価結果等、科学的な内容が表記されていないものがほとんどである。本プロジェクトで開発した微生物製剤は、構成する微生物の油分解メカニズムが明確であり、品質管理技術もほぼ確立された。これによって、微生物製剤に対する顧客・市場の信頼を得ることができ、従来の製品と比べより市場に浸透しやすく、市場占有率を加速的に増加できるものと期待される。

3 今後の展開

先述のとおり、本研究は確実に実用化に近づいてきている。今後、長期保存性、導入微生物のグリーストラップ内での優占化、厳冬期に固化した油分を効率的に分解できる技術の開発などの課題に取り組むことで、下に示す最終目標を達成する。それによって、さらに画期的な微生物製剤、デザイン化技術の確立を目指す。

今後の課題（プロジェクト平成23年度最終目標）

1. 微生物の活性を少なくとも半年間は維持する製剤化技術を確立する。
2. 油脂分解微生物がバイオフィーム中で優占化する技術を確立する。
3. 性質の異なる複数の分解菌を組み合わせることで、負荷や現場の環境変動に強く、分解能力を常に維持できる複合微生物製剤を開発する。さらにその品質管理もできるようにする。
4. 油脂の除去効率が、既製品の微生物製剤のみを利用した時と比較して 4 倍となるような、微生物製剤および機能性バイオフィームを開発する。

2.3 有用石油分解菌 *Cycloclasticus* のデザイン化に関する研究開発 (委託先 日本大学生物資源科学部)

1. 実用化の見通し

PAHs は、アルカンなどに比べ分解されにくいことから、これまでは分解に多くの時間を要した。本研究開発が成功し、*Cycloclasticus* の多様な PAHs 分解活性を制御できれば、バイオプロセス処理効率を大幅に促進できるものと期待される。

これまでの研究の成果から、S-2 EPS の投与による *Cycloclasticus* の複合微生物群集中での優占化の促進および同菌による PAHs の分解促進には、S-2 EPS 分子中に含まれるカルボキシル基、および脂肪酸が重要であることが大筋として明らかになった。このうちカルボキシル基は、鉄源のスカベンジングに難のある *Cycloclasticus* に対し、鉄源の局所的な高濃度化に関与しているものと考えられ、一方、脂肪酸は石油との相互作用に関与し、油的表面にバイオフィーム層を形成しているものと考えられる。このことから、実用化に向かって、これまでの研究の成果を利用し、安価で安定的に供給できる *Cycloclasticus* の培養支持体の開発を行っていく。本格的な検討は平成 22 年度より開始する予定であるが、平成 23 年度のプロジェクト終了時目標に S-2 EPS の代替手段の開発を行う。

2. 波及効果

本研究開発の成果は、特に、海洋での石油汚染の浄化、および高塩濃度の環境におけるプラント処理等における PAHs の分解促進に大きく貢献できるものと考えられる。*Cycloclasticus* の有する PAHs 分解酵素群は、芳香環を基本とした化学物質の改変・創製に利用できる。また、学術的な面では、複合微生物中に存在する希少な生理活性の誘導機構を明らかにできつつあることから、他のケースのモデルとなり、さらに複合微生物群集の新しい生理活性の誘導にも寄与できると考えられる。

3. 今後の展開

鉄を介した *Cycloclasticus*、PAHs、S-2 EPS の相互作用の詳細な検討
市販の多糖類を利用した物質改変と生理活性の確認
鉄源の種類、供給法等の検討
Cycloclasticus と他の微生物の人工共生系

2. 4 高濃度微生物保持DHSリアクターによる溶存メタン・亜酸化窒素温室効果ガスの処理およびリン回収技術の開発 (広島大学)

1. 実用化の見通し

模擬排水を用いた今までの検討で、DHS を用いるメタン酸化およびリン回収は当初想定した以上の良い結果を得ている。また、亜酸化窒素の分解に関しても、嫌気条件下での分解が確認できた。本技術の基礎となっている好気性 DHS リアクターの性能はインドや国内の下水処理場で既に実証・公表されており、DHS リアクターを用いる事に関しては何ら問題ない。したがって本プロジェクトをこのまま推進し、実排水を用いてその性能を実証できれば、問題なく実用化される事が期待できる。

2. 波及効果

従来の下水・排水処理技術に温室効果ガス処理・リン回収 DHS リアクターを組み合わせる事で、21 世紀型排水処理システムとして日本の技術を世界に向けて発信することができる。特に温室効果ガス排出削減は世界的な課題である事から、温室効果ガス処理 DHS リアクターを組み込んだ排水処理装置は世界的にも注目を浴びるものと期待できる。

3. 今後の展開

微生物保持能力が高く、エアレーションなしに酸素供給能に優れている好気性 DHS リアクターを地球温暖化防止および資源回収装置として適用拡大するため、今後、次のような研究開発を展開する。
①溶存メタン含有実排水を用いて DHS リアクターによる分解除去実験を行い、HRT 2 時間、溶存メタン除去率 90%以上を達成。
②実 N_2O 排ガスを用い、 N_2O 排ガスの滞留時間 1 日、 N_2O 除去率 90%以上を達成する。
③実際の排水を用い、流入リン濃度 $5mg\cdot P\cdot L^{-1}$ を 20 倍 ($100mg\cdot P\cdot L^{-1}$) 以上の濃縮リン含有液として回収する。

2.5 嫌気性アンモニア酸化プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発 (北海道大学 工学研究科)

1. 実用化の見通し

1. 嫌気性アンモニア酸化プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発 (北海道大学 工学研究科 岡部聡)

アンモニア性窒素の亜硝酸までの部分硝化および ANAMMOX 細菌の増殖促進を図るために微量のヒドロキシルアミン(NH_2OH)添加を行うというアイデアはオリジナルであり、本研究でその有用性が確認されれば、運転操作も容易でありかつヒドロキシルアミンは比較的安価であることから実用化が十分可能である。

Anammox リアクターはすでに十分な窒素除去能力を達成しており実用化が見えている。今後、有機物濃度、塩分濃度、および温度の anammox 活性に及ぼす影響などを検討することにより、より安定的なリアクターを構築できる。

これまでの研究から得られた基礎的な情報は、論文発表などを通して、微生物応用利用分野および水処理工学分野で情報発信を積極的に行っている。英文論文は4報発表済み、1報投稿中、和文論文は1報発表済みである。

2. 波及効果

本事業の研究開発の成果から、以下のような波及効果が期待できる。

- (1) このプロセスの開発導入により、従来の活性汚泥法を用いた硝化—脱窒法と比較して、15倍以上の窒素除去速度 ($30 \text{ Kg-TN/m}^3/\text{day}$) が得られる。また、理論的には50%以上のトータルランニングコストの削減、余剰汚泥の発生量を70%以下に削減が可能であり、高効率・省エネルギー、低コスト型の窒素除去システムを構築可能となる。これは、持続型社会の構築に大きく貢献する。
- (2) 公共用水域の富栄養化問題は長年の課題となっており、特に閉鎖性水域へ排出される排水の窒素・リンについては、今後さらに規制はさらに強化される。このような現状にあって、新規に導入される高度废水处理プロセスは、十分な処理性能だけでなく省資源・省エネルギー・低コスト性が要求される。このような社会的情勢は、提案する部分硝化—Anammox プロセスの実废水处理への導入のインセンティブとなり、早期実用化を加速すると考える。
- (3) Anammox 関連の研究開発において、日本は欧州の後塵を拝する状況にあるが、欧州においても、未だ高効率・安定的な Anammox リアクターの構築・運転技術は確立していない。この段階で、日本が英知を結集させ技術開発を積極的に推進すれば、必ず、欧州の技術に勝る「Anammox プロセス」が開発され、水処理(窒素除去)の市場を獲得できると確信している。

3. 今後の展開

最終目標を達成するために、今後、以下のような研究開発を展開する。

- (1) 今後、有機物濃度、塩分濃度、および温度の影響などを検討し、より安定的なリアクターを構築する。
- (2) ANAMMOX 細菌のゲノム情報に基づき、重要な代謝酵素遺伝子 (例えばヒドロキシルアミン酸化還元酵素 (HAO) およびヒドラジン酸化還元酵素の遺伝子など) を同定し、これを既存の酵素遺伝子と比較する。また、炭素固定 (同化反応) 経路を解析し、増殖に係わる因子 (コファクターやその他の基質など) を探索する。これらの結果をもとに最適運転条件を検討する。

2. 6 バイオフィルム工学による微生物のデザイン化 (北海道大学 地球環境科学研究所)

1. 実用化の見通し

これまでに環境汚染廃棄物（炭化水素類やタンパク質）分解細菌を自己凝集化あるいは複数種類の細菌と共にバイオフィルム化することにより、従来法に比べて長期間安定した現場浄化技術が提供できる可能性を示した。これを環境コンサルティング会社や建設会社と協力して実汚染現場に適用すれば処理コストを大幅に低減させることができる。またアンモニア酸化細菌を活性化させる新しい細菌を今年度内に取得できる見込みで、これをライセンス化し水処理施設に適用することによって廃水処理費用のコストダウンが可能となる。

2. 波及効果

本研究を進める中で、納豆菌をバイオフィルム形成させることによって脂溶性ビタミンであるメナキノン類を細胞外へ高効率に分泌できることを見出した。すなわち、バイオフィルム培養法は新しい生物生産技術として利用できる可能性がある。

3. 今後の展開

有用細菌バイオフィルムの廃棄物処理への適用範囲を拡大する。アンモニア酸化細菌の活性化を促進する細菌のコレクションを増やし、そのメカニズムを解明する。アナモックス細菌のゲノム情報を活用し、自己凝集活性を増強し、廃水処理効率を向上させる。

2. 7 システム論的アプローチによる微生物コミュニティデザイン (委託先 学校法人 早稲田大学)

1. 実用化の見通し

1. 8 システム論的アプローチによる微生物コミュニティデザイン (早稲田大学)

本研究で開発を目指している、システム論的アプローチを軸とした微生物コミュニティデザインの基盤技術は、微生物コミュニティの最適化および処理性能の予測を行うための強力な手法である。本手法のコンセプトを論文発表や学会発表を通して広く情報発信することで、実用化に向けた素地を作ることを目指している。

2. 波及効果

2. 8 システム論的アプローチによる微生物コミュニティデザイン (早稲田大学)

本手法のコンセプトは、特に複雑な好気性微生物処理システム（フロック・バイオフィルム・活性汚泥等）に適用した場合に、その有効性が発揮されるが、環境バイオ処理技術系一般に適用可能であり、当該分野への波及効果は大きいと予想される。

3. 今後の展開

3. 8 システム論的アプローチによる微生物コミュニティデザイン (早稲田大学)

窒素・リン同時除去型排水処理システムを用いて様々な条件下における排水処理能力等の実験データを蓄積し、構築したシミュレーションモデルによりその再現を試みる。その過程でモデルのブラッシュアップを行い、様々な条件に対応した汎用性の高いモデルを構築する。

2. 8 デザイン化微生物群を用いた高効率固定床メタン発酵の研究開発 (委託先 財団法人 電力中央研究所 共同実施先 東京大学)

非公開事業原簿に記載

2. 9 嫌気性微生物群のデザイン化による芳香族塩素化合物の嫌気性完全分解技術の開発 (委託先 名古屋大学 再委託先 基礎地盤コンサルタンツ株式会社)

実用化の見通し

1. 地下地盤、河川底質、干潟などの嫌気性環境に、ハロゲン化芳香族化合物を代表とする有害化学物質が残留するという多くの事例に対して、掘削や浚渫を伴わない原位置バイオレメディエーションの開発が期待されている。これまでバイオレメディエーションのために嫌気性脱塩素反応と好気性酸化分解反応の組み合わせが必須と考えられてきたが、嫌気・好気の切り替えは非現実的で実用化されてこなかった。本研究開発によって、単に嫌気性条件だけでも完全分解が可能で、嫌気性原位置バイオレメディエーションという新技術への展開が可能であることを明らかにした。即ち、ペンタクロロフェノールを対象に、嫌気性脱塩素菌群と嫌気性芳香族酸化分解菌を選抜し、無機担体上へのデザイン化による嫌気性のままでの完全分解を可能とした。また、透過性反応浄化壁として必要な活性 (50 μM のペンタクロロフェノールを 30 日以内に完全分解) を、嫌気性脱塩素微生物と好気性芳香族酸化分解菌を組み合わせる場合の半分程度のコンパクト化によっても得られる目処が得られた。

また、掘削・浚渫したドラム缶中に保持された土砂・底質の浄化も、本技術の適用によってドラム缶中に密閉封じ込め維持したまま浄化が可能になることが期待される。

これまでに用いられている原位置浄化は、溶解固化(ジオメルト)工法や、鉄(0)を用いた透過性反応壁浄化工法の化学反応技術に限られる。しかし、ジオメルト工法は土粒子を 1600°C の高熱にするために非常に高コストであること、また鉄(0)を用いた反応性透過壁工法では脱塩素はできても芳香環の分解はできない。通常は、遮水・掘削後に浄化处理して埋め戻しが行われている。ペンタクロロフェノールの汚染が表層土から地下水にかけてみられる場面を想定 (面積 1000m²、地下水面 GL-3m、不透水層 GL-7m) すると、汚染土の遮水・掘削除去後に熱脱着して埋め戻しという現在用いられている方法の場合、47,780 千円、453t-CO₂ と推算されるのに対し、本開発技術が実用化されて透過性反応浄化壁を作った場合、31,360 千円、168t-CO₂ と推定され、低コスト化と省エネルギーを達成できるものと予想される。本開発中の原位置嫌気性バイオレメディエーション技術は、競争力を十分有するものと期待できる。

波及効果

2. 嫌気性環境において脱塩素微生物と芳香族酸化分解菌を組み合わせる完全分解技術の開発を通して、嫌気性条件だけで完全分解を行う原位置バイオレメディエーション技術の適用が可能であることが明かとなった。地下地盤、河川底質、干潟などの嫌気性環境に、ハロゲン化芳香族化合物を代表とする有害化学物質が残留する例が多く知られ、それらの浄化で必要とされた掘削・浚渫を行わないで嫌気性条件のまま原位置バイオレメディエーションする新たなビジネスの確立が期待される。また、それによってこれまで放置されてきた嫌気性環境に残留するハロゲン化芳香族化合物の浄化が可能となり、社会的にも意義が大きい。透過性反応浄化壁やドラム缶保管汚染土の密閉封じ込め浄化技術などの直接的実用化以外に、工場用地などでのバリヤなどの応用も期待される。原位置シミュレーションの確立によって、現地の自然減衰・促進減衰の浄化期間予測の精度向上が期待される。また、生理学的に異なる複数の嫌気性有用微生物を資材として用いる微生物資材化によるオーギュメンテーション技術という要素技術開発によって環境中への微生物の新規導入法の確立も期待される。また、簡易病原微生物スクリーニング技術によって、各種の微生物利用技術における微生物スクリーニングの迅速化が期待される。更に、本研究プロジェクトの推進によって当該分野における人材育成にもつながっている。

今後の展開

3. 本研究は、中間目標として比較的水溶性のクロロフェノール類を対象として研究開発をおこなってきた。後半では、ポリ塩化ビフェニルの様な、より難分解性の芳香族塩素化合物を研究対象として、本嫌気性微生物群のデザイン化によるバイオレメディエーション技術の対象化合物の拡大をはかる。また、安全性を高めるために浄化に有用な非病原性微生物の獲得努力を続ける。

クロロフェノール類を対象とする浄化技術は、これまでの研究開発成果をもとに、河川底や地下水に対する微生物反応浄化壁とする実用工法の開発へ向けた展開が期待される。そこで、流れ場でのクロロフェノール類（ $50 \mu\text{M}$ ）完全分解（30日未満）能力の地下水環境での長期維持試験を行って実用性の検証を行う。また、将来的には渡り鳥で重要な干潟や遠浅海岸の底質の浄化を目指した技術展開も予想される。また、著しい汚染が見られる中華人民共和国との技術提携によるビジネス展開も考えられる。

(別紙) 特許、論文発表等の成果リスト

1 内生呼吸低減菌等の有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発

(委託先：株式会社日立プラントテクノロジー 再委託先：中央大学)

(新聞・雑誌等掲載)

- ・水環境学会第43回年会講演 21年3月16日
「廃水処理の曝気量低減に向けた基礎的検討」
- ・韓国微生物学会 21年6月1日
「A Novel Method for Rapid and Simultaneous Quantification of Gaseous Substrates and Metabolites for Microorganisms」
- ・IWA ASPIRE 21年10月
「Experimental Investigation of Reducing Aeration in Wastewater Treatment」

2 厨房廃水処理用油脂分解バイオフィームの高機能化・安定化のための微生物製剤導入技術の研究開発

(委託先：名古屋工業大学 共同実施先：愛知県産業技術研究所)

(特許)

2009. 3. 27 特願 2009-79299 リパーゼまたはその分泌微生物と加水分解生成物分解微生物との複合効果による油脂含有排水の処理方法とグリーストラップ浄化方法及び油脂分解剤

2009. 3. 27 特願 2009-79432 弱酸性条件で増殖・油脂分解可能なリパーゼ分泌微生物による油脂含有排水の処理方法とグリーストラップ浄化方法及び油脂分解剤

(論文発表)

- ・Journal of Bioscience and Bioengineering 2009.4
Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation
Hiroshi Matsuoka, Atsuto Miura, Katsutoshi Hori

(口頭発表)

- ・化学工学会第74年会(化学工学会) 2009. 3. 20
油脂分解微生物の混合培養によるトリアシルグリセロールの効率的分解
名古屋工業大学 松岡 浩史三浦, 篤人, 堀 克敏
- ・日本農芸化学会 2009 年度大会(日本農芸化学会) 2009. 3. 29
トリアシルグリセロール分解におけるリパーゼ分泌細菌 *Burkholderia arboris* SL1B1 およびグリセロール資化酵母 *Candida cylindracea* SL1B2 の共生効果
名古屋工業大学 松岡 浩史三浦, 篤人, 堀 克敏

3 有用石油分解菌 *Cycloclasticus* のデザイン化に関する研究開発

(委託先：日本大学)

(特許)

- ・2009/08 「マクネシウムを使った培地/有機溶媒二層培養系における細胞の局在性の制御法」の特許を出願予定

(論文発表)

- ・日本防菌防黴学会誌 平成 20 年 10 月

環境浄化とバイオフィルム-EPS による微生物群集の制御 (岩淵範之)

- Environmental Science and Technology 投稿中

Role of Interfacial Tensions in the Translocation of *Rhodococcus erythropolis* during Growth in a Two Phase Culture

Noriyuki Iwabuchi, Prashant K. Sharma, Michio Sunairi, Emi Kishi, Kazushige Sugita, Henny C. van der Mei, Mutsuyasu Nakajima, Henk J. Busscher

(口頭発表)

- 理研 BRC 国際シンポジウム (理研 BRC) 2009/2/10

複合微生物系の培養制御技術の開発と海洋石油汚染浄化への応用

日本大学生物資源科学部 岩淵範之

- 日本農芸化学会シンポジウム、バイオフィルムの新展開ー有効利用と新しい可能性ー

(日本農芸化学会) 2009/3/28

油ー微生物の相互作用におけるバイオフィルムの役割を考える

日本大学生物資源科学部 岩淵範之

- 日本農芸化学会 (日本農芸化学会) 2009/3/28

Cycloclasticus 属細菌の多環芳香族炭化水素(PAHs)の分解に対する鉄の影響

日本大学生物資源科学部 竹石英伯、萩原淳、砂入道夫、中嶋睦安、岩淵 範之

- Bacterial Adherence & Biofilm 第23回学術集会シンポジウム

(Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会) 2009/7/11

油ー微生物の相互作用における細胞外多糖(EPS)の影響

日本大学生物資源科学部 岩淵範之

(その他)

- 2009/3/28 日本農芸化学会 2009 年度大会のシンポジウムの公募において、「バイオフィルムの新展開ー有効利用と新しい可能性ー」のシンポジウムを提案し、採択され、同シンポジウムを遂行した。

4 高濃度微生物保持 DHS リアクターによる溶存メタン・亜酸化窒素温室効果ガスの処理およびリン回収技術の開発

(委託先 : 広島大学)

(特許)

- 2009/2/26 特願 2009-44797 リンの回収方法及び回収装置

(論文発表)

- 環境工学論文集 投稿中

密閉型 DHS リアクターによるリン含有水の高濃度化回収

小寺博也、幡本将史、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良

- 環境工学論文集 投稿中

DHS リアクターによる溶存メタンの生物学的酸化分解処理

幡本将史、山本弘毅、金田一智規、尾崎則篤、大橋 晶良

(口頭発表)

- 第60回土木学会中国支部研究発表会 (土木学会中国支部) 2008/5/31

生物学的リン回収に及ぼす嫌気・好気サイクルの影響

- 広島大学 小寺博也・大橋晶良・尾崎則篤・金田一智規
- ・ 第 6 0 回土木学会中国支部研究発表会 (土木学会中国支部) 2008/5/31
微生物による亜酸化窒素 (N₂O) 酸化分解能の調査
広島大学 阿部憲一・水嶋康介・金田一智規・尾崎則篤・大橋晶良
 - ・ 第 63 回 土木学会 年次学術講演会 (土木学会) 2008.91
生物学的リン回収における嫌気・好気時間の影響
広島大学 小寺博也・大橋晶良・尾崎則篤・金田一智規
 - ・ International Conference on Civil and Environmental Engineering(ICCEE-2008)
(Dept. of Social and Environmental Engineering, Hiroshima University) 2008/10/9
EFFECT OF ANAEROBIC/AEROBIC INTERVAL ON ENHANCED BIOLOGICAL
PHOSPHORUS REMOVAL USING TUBULAR BIOFILM REACTOR
広島大学 Hiroya Kodera, Akiyoshi Ohashi, Noriatu Ozaki and Tomonori Kindaichi
 - ・ 第 43 回水環境学会年会(日本水環境学会) 2009/3/16
窒素除去プロセスにおける亜酸化窒素の発生
広島大学 阿部憲一、山口隆司、幡本将史、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良
 - ・ 第 43 回水環境学会年会(日本水環境学会) 2009/3/16
Investigation of Nitrous Oxide Degradation by Biological Oxidation
広島大学 ツォン ホエイピン、金田一智規、大橋晶良
 - ・ 第 43 回水環境学会年会(日本水環境学会) 2009/3/16
嫌気メタン酸化と脱窒の共役を利用した温室効果ガスの生物学的除去プロセスの開発
広島大学 山本崇寛、幡本将史、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良
 - ・ 第 43 回水環境学会年会(日本水環境学会) 2009/3/17
溶存メタン処理リアクターにおいてメタンの分解に関与する微生物群集
広島大学 山本崇寛、幡本将史、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良
 - ・ 第 43 回水環境学会年会(日本水環境学会) 2009/3/18
DHS リアクターを用いた溶存メタンの生物学的酸化分解処理
広島大学 山本崇寛、幡本将史、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良
 - ・ 第 43 回水環境学会年会(日本水環境学会) 2009/3/18
DHS リアクターを用いた新しいリン回収技術
広島大学 山本崇寛、幡本将史、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良
 - ・ International Symposium on Green Technology for Global Carbon Cycle in Asia
(Nagaoka University of Technology) 2009/3/23
Investigation of the optimum time for EBPR with tubular reactor
広島大学 H. Kodera, T. Kindaichi, N. Ozaki, and A. Ohashi
 - ・ International Symposium on Green Technology for Global Carbon Cycle in Asia
(Nagaoka University of Technology) 2009/3/23
Biological dissolved methane treatment using closed DHS reactor
広島大学 M.Hatamoto,H.Yamamoto, T. Kindaichi,N.Ozaki, and A. Ohashi
 - ・ Specialised Conference on Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment
(International Water Association) 2009/5/26

Methane oxidizing bacteria in closed DHS reactor treating dissolved methane in anaerobic wastewater treatment effluent

広島大学 M. Hatamoto, H. Yamamoto, T. Kindaichi, N. Ozaki, and A. Ohashi

(受賞実績)

International Conference on Civil and Environmental Engineering (ICCEE-2008) Best poster award

Dept. of Social and Environmental Engineering, Hiroshima University

Best poster award (ICCEE-2008) 2008/10/9

5 嫌気性アンモニア酸化(ANAMMOX)プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発

(委託先：北海道大学工学研究科)

(論文発表)

1. Sun-Ja Cho, Yoshitaka Takahashi, Naoki Fujii, Yohei Yamada, Hisashi Satoh, and Satoshi Okabe (in preparation) Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*

2. 高橋 慶考、對馬 育夫、下川 正貴、岡部 聡 (2007) 二段ステップ流入式上向流型 ANAMMOXリアクターにおける処理性の評価、環境工学論文集、Vol.44, Pp.201-206.

3. Kindaichi, T., Tsushima, I., Ogasawara, Y., Shimokawa, M., Ozaki, N., Satoh, H., and Okabe, S. (2007) *In Situ* Activity and Spatial Organization of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria in Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 73 (15), Pp. 4931-4939.

4. Tsushima, I., Ogasawara, Y., Shimokawa, M., Kindaichi, T., and Okabe, S. (2007) Development of a super high-rate ANAMMOX reactor and in situ analysis of biofilm structure and function. *Water Science and Technology* Vol. 55(8/9) Pp.9-17.

5. Tsushima, I., Kindaichi, T., and Okabe, S. (2007) Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research* Vol. 41 (4), Pp. 785-794.

6. Tsushima, I., Ogasawara, Y., Shimokawa, M., Kindaichi, T., and Okabe, S. (2007) Development of High-Rate Anaerobic Ammonium-Oxidizing (ANAMMOX) Biofilm Reactors. *Water Research* Vol. 41 (8), Pp. 1623-1634.

7. Hisashi Satoh, Yuki Miura, Ikuo Tsushima, and Satoshi Okabe (2007) Layered Structure of Bacterial and Archaeal Communities and Their In Situ Activities in Anaerobic Granules. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 73 (22), Pp. 7300-7307.

総説, 解説, 評論等

佐藤久、岡部聡. (2008) 水系生物膜内の微生物活性解析への微小電極の適用、月刊「水」、Vol.50-10、(No.720)、p20-28.

口頭発表

Okabe S. In situ activity and spatial organization of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (Anammox) in biofilms. IWA Biofilm Technologies Conference, Singapore, January, 8-10, (2008)

Satoh H., and Okabe S. (2008) Application of microsensors to in situ measurements of microbial activities in biofilms. 1st IWA Asia-Pacific Young Water Professionals Conference (Special Lecture), Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju, Korea. 8-10 Dec.

高橋慶考、Sun-Ja Cho、藤井直基、岡部 聡 (2008) 上向流固定床型リアクターにおける部分硝化反応の制御及び評価、第 45 回環境工学研究フォーラム講演集、大阪工業大学.

山田 陽平、佐藤 久、岡部 聡、三浦 佑己、曹 順子. (2008) 微小電極を用いた ANAMMOX グラニューール内の微生物活性の解析、第 45 回環境工学研究フォーラム講演集、大阪工業大学.

山田陽平、三浦佑己、曹順子、佐藤久、岡部聡. (2008) ANAMMOX グラニューールの物理的性質および機能、土木学会 全国大会 第 63 回年次学術講演会、東北大学.

下川正貴、對馬育夫、金田一智規、岡部聡. (2008) 嫌気性アンモニア酸化 (ANAMMOX) 細菌の生理・生態学的特性評価 第 42 回日本水環境学会年会

曹順子、藤井直基、佐藤久、岡部聡. (2008) Nitrogen removal performance of an up-flow granular bed anammox reactor 第 42 回日本水環境学会年会

6 バイオフィーム工学による微生物のデザイン化の研究開発

(委託先：北海道大学地球環境科学研究所)

(論文発表)

- Biosci Biotechnol Biochem, 71, 2002-2007 2007. 8.
Functional analysis of a pyoverdine synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38.
Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M.
- 食品衛生学雑誌, 48, J389-J396 (2007) 2007. 12.
バイオフィームの功罪 (森川正章)
- Int Biodeter Biodegr, 61, 223-232 2008. 4.
A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristics.
Ito H, Hosokawa R, Morikawa M, Okuyama H.
- Biosci Biotechnol Biochem, 72, 2061-2068 2008. 8.
Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*.
Thaniyavarn J, Chianguthai T, Sangvanich P, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M, Thaniyavarn S.
- Biotechnol Lett, 30, 1447-1452 2008. 8.
Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane.
Takei D, Washio K, Morikawa M.
- 化学と生物, 46, 682-688 (2008) 2008. 10.
持続的環境浄化技術を拓くウキクサと根圏微生物の共生系
山賀文子, 鷺尾健司, 森川正章
- Microbial Biotechnol. 2, 361-369 2009. 3.
Biofilm formation and proteolytic activities of *Pseudoalteromonas* bacteria that were isolated from fish farm sediments.
Iijima S, Washio K, Okahara R, Morikawa M.
- J. Appl. Microbiol. 107, 157-166 2009. 4.
Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in *Pseudomonas* sp. MIS38.
Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M.
- BMC Microbiology 9, 60 2009. 4.
Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23
Kato T, Miyanaga A, Kanaya S, Morikawa M.

- Environ Sci Technol. Submitted
Examination of *Pseudomonas stutzeri* T102 biofilms toward continuous bioremediation technology
Shimada K, Ito Y, Washio K, Morikawa M.
 - Microbial Biotechnol. Submitted
Sustainable rhizoremediation of phenols by *Lemna perpusila* and *Acinetobacter* sp. P23
Yamaga F, Ito Y, Washio K, Morikawa M.
- (新聞・雑誌等掲載)
- 化学と生物 10月号 (学会出版センター) 2008.10.1.
持続的環境浄化技術を拓くウキクサと根圏微生物共生系
 - 日本経済新聞 (地方経済面) 2008.7.29.
細菌使い土壌浄化
 - 特許出願中 2008-099213号 2008.4.7.
新規水草根圏微生物／森川正章、山賀文子、鷺尾健司 (出願人 北海道大学総長)
 - バイオフィルムの基礎と制御 (NTS 出版) 2008.2.4.
バイオフィルムの基礎と制御
 - 食品衛生学会誌(48巻6号) 2007.12.1.
バイオフィルムの功罪
- (口頭発表)
- 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2007 (生化学会) 2007.12.12-14
Pseudomonas sp. MIS38 株由来の二つの環状リポペプチド類 ABC-トランスポーター
北海道大学 Siew Ping Lim
 - 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2007 (生化学会) 2007.12.12-14
Pseudomonas sp. MIS38 株の成長相とバイオサーファクタント生産
北海道大学 鷺尾健司
 - 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2007 (生化学会) 2007.12.12-14
フタル酸エステル分解細菌の単離と諸特性解析
北海道大学 菅原寛明
 - 日本農芸化学会 2007 年度大会 (農芸化学会) 2007.3.25
MIS38 株が産生する環状リポペプチドの生成機構の解析
北海道大学 鷺尾健司
 - 日本農芸化学会 2007 年度大会 (農芸化学会) 2007.3.26
水生植物からの汚染物質分解能を有する微生物の探索
北海道大学 山賀文子
 - 日本農芸化学会 2007 年度大会 (農芸化学会) 2007.3.26
海洋性細菌を用いた複数種バイオフィルム形成能の評価
北海道大学 柞木田 なつみ
 - 日本農芸化学会 2007 年度大会 (農芸化学会) 2007.3.26
枯草菌バイオフィルム形成に与えるサーファクチン生産の影響
北海道大学 相原 悠
 - 日清製粉研究所セミナー (日清製粉研究所) 2007.4.23

バイオフィームとバイオサーファクタント

北海道大学 森川正章

- ASM 107th Meeting (ASM) 2007.5.22-26
Pseudomonas 属細菌 MIS38 におけるアルスロファクチンの輸送に関与する遺伝子
北海道大学 森川正章
- 第 8 回 酵素応用シンポジウム (天野エンザイム) 2007.6.15
非リボソーム型ペプチド合成酵素の解析と機能改変
北海道大学 森川正章
- 環境バイオテクノロジー学会 2007 年度大会 (環境バイオテクノロジー学会) 2007.6.26-27
Pseudomonas stutzeri バイオフィームのナフタレン分解活性と土壌安定性
北海道大学 嶋田恒平
- 環境バイオテクノロジー学会 2007 年度大会 (環境バイオテクノロジー学会) 2007.6.26-27
細菌バイオフィームと浮遊細胞の耐熱性比較
北海道大学 東條ふゆみ
- 環境バイオテクノロジー学会 2007 年度大会 (環境バイオテクノロジー学会) 2007.6.26-27
フタル酸エステル分解細菌の単離と諸特性解析
北海道大学 菅原寛明
- 日本農芸化学会 2008 年度大会 (農芸化学会) 2008.3.27-29
小便器内壁から単離した細菌のバイオフィーム形成能
北海道大学 大木海平
- 日本農芸化学会 2008 年度大会 (農芸化学会) 2008.3.27-29
Pseudomonas stutzeri バイオフィームのナフタレン分解活性と土壌安定性
北海道大学 嶋田恒平
- 日本農芸化学会 2008 年度大会 (農芸化学会) 2008.3.27-29
食中毒原因細菌のバイオフィームと浮遊細胞の加熱処理耐性比較
北海道大学 東條ふゆみ
- 日本農芸化学会 2008 年度大会 (農芸化学会) 2008.3.27-29
超好熱性アーキア Thermococcus kodakaraensis KOD1 の浮遊細胞とコロニー細胞を用いたプロテオーム解析
北海道大学 阿形朋子
- iBIO2008 (BIT Lifesciences, Shanghai) 2008.5.19
Efficacy of biofilm formation by a phthalene degrading Pseudomonas stutzeri T102 toward bioremediation technology.
北海道大学 森川正章
- East China University of Science and Technology 2008.5.20
A lipopeptide biosurfactant produced by Pseudomonas sp. MIS38, characterization and functional analyses of the synthetase gene
北海道大学 森川正章
- ASM 108th Meeting (ASM) 2008.6.1-5
Biofilm formation by Bacillus subtilis 168, incompatible function of sfp

北海道大学 森川正章

- ASM 108th Meeting (ASM) 2008.6.1-5
Efficacy of biofilm formation by a phthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology.
北海道大学 嶋田恒平
- 環境バイオテクノロジー学会 2008 年度大会 (環境バイオテクノロジー学会) 2008.6.25-26
新規アゾ染料分解脱色細菌の探索
北海道大学 Volta R. T. Gurning
- ARO workshop (Army Research Office, USA) 2008.9.22
Advances in Biofilm Research to Inhibit Biocorrosion.
北海道大学 森川正章
- 日本微生物生態学会 20 年度大会 (日本微生物生態学会) 2008.11.26-27
バイオフィームを利用した持続的環境浄化技術の基盤開発
北海道大学 森川正章
- 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2008 (生化学会) 2008.12.9-12
Staphylococcus 属細菌のバイオフィーム形成における尿素分解酵素 (ウレアーゼ) の役割
北海道大学 大木海平
- 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2008 (生化学会) 2008.12.9-12
環状リポペプチド、アルスロファクチンの産生を制御する (p)ppGpp 合成・代謝酵素、SpoT の機能解析
北海道大学 鷺尾健司
- International symposium on Biotechnological Approaches to Environmental Science for Energy Production and Sustainability (全南大学 [韓国]) 2009.2.23-28
Sustainable Bioremediation Technology by Utilizing Biofilms
北海道大学 森川正章
- 日本農芸化学会 2009 年度大会 (農芸化学会) 2009.3.27-29
Anammox 細菌のグラニュール形成に関するプロテオミク解析
北海道大学 東條ふゆみ
- 日本農芸化学会 2009 年度大会 (農芸化学会) 2009.3.27-29
根圏細菌 *Acinetobacter* sp. P23 株のバイオフィーム形成遺伝子の探索
北海道大学 羽山亨
- 日本農芸化学会 2009 年度大会 (農芸化学会) 2009.3.27-29
バイオフィーム形成能の高いアルカン分解細菌の探索
北海道大学 高橋康德
- 日本農芸化学会 2009 年度大会 (農芸化学会) 2009.3.27-29
枯草菌バイオフィームによるメナキノンの菌体外生産
北海道大学 山崎和彦
- 日本農芸化学会年次大会シンポジウム (農芸化学会) 2009.3.28.
バイオフィーム利用の将来展望
北海道大学 森川正章
- Biosurfactant workshop 2009 (Institute of Biotechnology) 2009.4.25-30

Genetic analysis of synthetic regulation and transportation of lipopeptide type biosurfactant

北海道大学 森川正章

- ・環境バイオテクノロジー学会 2009 年度大会 (環境バイオテクノロジー学会) 2009.6.23-24
微生物によるジクロロメタン分解に関する研究
北海道大学 菅田曜
- ・環境バイオテクノロジー学会 2009 年度大会 (環境バイオテクノロジー学会) 2009.6.23-24
バイオフィームに見られるナフタレン分解活性遅延の理由
北海道大学 森川正章
(新聞・雑誌等掲載)
- ・化学と生物 10 月号 (学会出版センター) 2008.10.1.
持続的環境浄化技術を拓くウキクサと根圏微生物共生系
- ・日本経済新聞 (地方経済面) 2008.7.29.
細菌使い土壌浄化
- ・特許出願中 2008-099213 号 2008.4.7.
新規水草根圏微生物 / 森川正章、山賀文子、鷲尾健司 (出願人 北海道大学総長)
- ・バイオフィームの基礎と制御 (NTS 出版) 2008.2.4.
バイオフィームの基礎と制御
- ・食品衛生学会誌 (48 巻 6 号) 2007.12.1.
バイオフィームの功罪

7 システム論的アプローチによる微生物コミュニティデザインの研究開発

(委託先: 早稲田大学)

(口頭発表)

- ・定量生物学の会第 1 回年会 (定量生物学の会) 2009/1/11
バクテリアによる自己造粒体 (グラニューール) 形成過程のマルチスケールモデリング
早稲田大学 加川友己、田畑潤也、岸田直裕、松本慎也、青井議輝、常田聡、
C. Picioreanu、M. C. M. van Loosdrecht
- ・第 43 回日本水環境学会年会 (日本水環境学会) 2009/3/18
好気性グラニューールを用いた窒素・リン同時除去プロセスの数理モデリングとシミュレーション
早稲田大学 加川友己、田畑潤也、岸田直裕、松本慎也、青井議輝、常田聡、
C. Picioreanu、M. C. M. van Loosdrecht
- ・Specialised Conference on Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment (ASPD5)
(The IWA specialist group on Activated Sludge Population Dynamics) 2009/5/27
Microscopic and macroscopic models for aerobic granular sludge processes
早稲田大学 Y. Kagawa, S. Matsumoto, J. Tahata, N. Kishida, Y. Aoi, S. Tsuneda, C. Picioreanu, and
M.C.M. van Loosdrecht

8 デザイン化微生物群を用いた高効率固定床メタン発酵の研究開発

(委託先: 電力中央研究所 共同実施先: 東京大学)

(特許)

- 2009/3/12 電気培養方法及び電気培養装置（露出型） 特許出願中
出願番号 特願 2009-59787 平野他
- 2009/3/31 微生物群担持担体の作製方法並びに微生物を利用した物質処理方法及び物質生産方法
特許出願中 出願番号 特願 2009-87161 佐々木他

(論文発表)

- Journal of Bioscience and Bioengineering 印刷中
Effect of adding carbon fiber textiles to methanogenic bioreactors used to treat an artificial garbage slurry (佐々木他)
- Applied and Environmental Microbiology 投稿中
Structures of microbial communities on supporting materials with varying characteristics in methanogenic bioreactors treating organic solid waste (佐々木他)

(口頭発表)

- 日本農芸化学会 2007 年度大会 (日本農芸化学会) 2008/3/28
固定床式メタン発酵槽における担体充填の効果
電力中央研究所 佐々木他
- 日本農芸化学会 2008 年度大会 (日本農芸化学会) 2008/8/28
担体の表面性質が固定床式メタン発酵に及ぼす影響
電力中央研究所 佐々木他
- 日本農芸化学会 2009 年度大会 (日本農芸化学会) 2009/3/28
三次元構造を持つ担体が固定床式メタン発酵に及ぼす影響
電力中央研究所 佐々木他
- American Society for Microbiology 109th General Meeting
(American Society for Microbiology) 2009/5/18
Microbial community structure in methanogenic bioreactors packed with supporting materials with varying surface properties
電力中央研究所 佐々木他

9 嫌気性微生物群のデザイン化による芳香族塩素化合物の嫌気性完全分解技術の開発

(委託先：名古屋大学 再委託先：基礎地盤コンサルタンツ株式会社)

(論文発表)

1. Daisuke Baba, Hiroshi Okumura, Arata Katayama (2007) Microbial anaerobic degradation of polychlorinated biphenyls in the culture containing burnt inorganic materials, Proceedings of International Symposium on EcoTopia Sciences 2007, Nagoya University, Nagoya, 23-25 Nov. 2007.
2. Yasushi Inoue, Kazuya Shimada, Arata Katayama (2007) Correlation between bacteria and soil particles transported from packed river sand, Proceedings of International Symposium on EcoTopia Sciences 2007, Nagoya University, Nagoya, 23-25 Nov. 2007.
3. Suyin Yang, Atsushi Shibata, Naoko Yoshida and Arata Katayama (2007) Anaerobic degradation of phenol by enrichment cultures under sulfate- and iron-reducing conditions, Proceedings of International Symposium on EcoTopia Sciences 2007, Nagoya University, Nagoya, 23-25 Nov. 2007.

4. Song, D., Kitamura, M., Katayama, A. (2007) Relationship between substrate-induced respiration rate and respiratory quinone amount in hydrocarbon-contaminated subsurface soil. Proceedings of International Symposium on EcoTopia Sciences 2007, Nagoya University, Nagoya Japan, 23-25 Nov. 2007.
5. Suyin Yang, Naoko Yoshida, Daisuke Baba, Arata Katayama (2008) Anaerobic biodegradation of biphenyl in various paddy soils and river sediment, **Chemosphere**, 71, 328-336
6. Suyin Yang, Atsushi Shibata, Naoko Yoshida, Arata Katayama (2009) Anaerobic mineralization of pentachlorophenol (PCP) by combining PCP-dechlorinating and phenol-degrading cultures, **Biotechnology and Bioengineering**, **Biotechnology and Bioengineering**, 102 (1), 81-90
7. Naoko Yoshida, Lizhen Ye, Daisuke Baba and Arata Katayama (2009) A Novel *Dehalobacter* sp. is involved in extensive 4,5,6,7-tetrachlorophthalide (fthalide) dechlorination. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(8), 2400-2405
8. Katayama A, Yoshida N, Baba D, Li Z, Yang S, Shibata A, Mizoguchi T, Taira A, Shimizu Y, Miyamoto T, Inoue Y, (2009.8) Enrichment of anaerobic bio-dechlorination activity of chlorinated aromatics from paddy soil for bioremediation technology, the 29th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin 2009), Beijing, 23rd-28th August 2009
9. Zhiling LI, Yasushi INOUE, Naoko YOSHIDA, Suyin YANG, and Arata KATAYAMA (2009.9) Complete dechlorination of pentachlorophenol in an anaerobic microbial column, R'09 Twin World Congress, Resource Management and Technology for Material and Energy Efficiency, Nagoya Japan/ Davos Switzerland, 14th-16th September 2009
10. Suyin Yang, Atsushi Shibata, Naoko Yoshida, Arata Katayama "Anaerobic biodegradation of phenol derivatives" in XXth Jubilee National, VIIIth International conference, Water Supply and Water Quality 2008, vol.II, (Ed. By Sozański, M.M., Dymaczeński, Z., Jeż-Walkowiak, J.) 399-402, Zakład Poligraficzny Moś-Lucszak sp. j. ul. Piwna 1, 61-065 Poznań, Gniezno, Polska 2008.(ISBN 978-83-89696-20-7)

(口頭発表)

1. Yukina Yoshida, Ayumi Shimizu, Daisuke Baba, Naoko Yoshida, Yasushi Inoue, Arata Katayama (2007) Effect of particle size on the structure of microbial community in the culture containing glass beads, 第23回日本微生物生態学会、愛媛大学、2007年9月15日～18日
2. Naoko Yoshida, Lyzhen Ye, Arata Katayama (2007) Characterization of two novel *Dehalobacter* species dechlorinating polychlorinated biphenyls and dibenzo-p-dioxins, 第23回日本微生物生態学会、愛媛大学、2007年9月15日～18日
3. 井上康、山川哲、Tien Hong Throung、片山新太 (2007) 多孔体中における二重間隙微生物輸送モデルのパラメータ推定、日本地下水学会 2007年秋季講演会 長野市若里市民文化ホール 2007年11月1日～3日
4. 下條祐樹、井上康、山川哲、片山新太 (2007) 多孔体中での微生物輸送・吸脱着に対する二重間隙モデルの適用性、環境工学研究フォーラム 山口大学常盤キャンパス 2007年11月16日～18日
5. 吉田奈央子、葉麗珍、片山新太 (2008) 固形電子供与体を用いたデハロバクター属細菌による芳香族塩素化合物の脱塩素化、第42回日本水環境学会、名古屋大学、2008年3月19日～21日
6. Tien, Hong Truong, 井上康、片山新太 (2008) 多環芳香族化合物に対する界面活性剤による促進型バイオレメディエーションのモデル構築、第42回日本水環境学会、名古屋大学、2008年3月19日～21日
7. 馬場 大輔, 片山 新太 (2008) 嫌氣的ポリ塩化ビフェニル分解コンソーシアの分解スペクトラム、第42回日本水環境学会、名古屋大学、2008年3月19日～21日

8. 宮本 隆史、井上 康、片山 新太、吉田 奈央子、奥村 洋 (2008.9) 担体と生分解性プラスチック、嫌気性微生物群を用いた芳香族塩素化合物の脱塩素反応を行う透過性反応壁、土木学会平成 20 年度全国大会、東北大学川内北キャンパス・仙台国際センター、平成 20 年 9 月 10 日 (水) ~12 日 (金)
9. 井上 康、下條佑樹、片山新太 (2008) Two-region, three-site モデルによる多孔体中の一次元微生物輸送プロセスの再現、日本地下水学会 2008 年秋季講演会 (福岡大会) 九州大学医学部 百年講堂、2008 年 11 月 20 日 ~22 日
10. Gunawan Hadiko, Doi R, Hirabayashi D, Suzuki K, Katayama A (2009) Development of porous ceramic carriers for anaerobic microbial consortium immobilization, 第 47 回セラミックス基礎科学討論会、大阪国際会議場、2009 年 1 月 8 日~9 日
11. 楊素銀、李智灵、大畑奈緒子、土居良一、井上康、片山新太 (2009) 脱塩素菌群と嫌気性酸化分解菌群を組み合わせたペンタクロロフェノールの無機化促進、日本農薬学会 34 回大会、東京大学、2009 年 3 月 17 日~19 日
12. 大畑 奈緒子、馬場 大輔、片山 新太 (2009.3) 嫌氣的 PCB 混合物分解微生物群集の液体培養とその特性評価、日本農芸化学会 2009 年度(平成 21 年度)大会、福岡 (福岡国際会議場、マリンメッセ福岡) ポスター発表
13. 井上 康、山川 哲、河合桃子、Tien Hong Truong、片山新太 (2009.6) 多環芳香族炭化水素の界面活性剤を用いた促進型バイオレメディエーションモデルの構築、第 15 回地下水土壤汚染とその防止対策に関する研究集会、口頭+ポスターハイブリッド形式、名古屋 (名古屋国際会議場白鳥ホール、名古屋市熱田区熱田西町) 2009 年 6 月 18 日~19 日
14. 宮本隆史、井上 康、吉田奈央子、片山新太 (2009.6) 嫌気性資材を用いた脱塩素反応を行うバイオバリアに関する研究、第 15 回地下水土壤汚染とその防止対策に関する研究集会、口頭+ポスターハイブリッド形式、名古屋 (名古屋国際会議場白鳥ホール、名古屋市熱田区熱田西町) 2009 年 6 月 18 日~19 日
15. 原 茂樹、清水洋平、溝口卓弥、井上 康、吉田奈央子、片山新太 (2009.6) 複合微生物群を用いたトリクロロフェノールの嫌氣的脱塩素化カラムの活性と透水性、第15回地下水土壤汚染とその防止対策に関する研究集会、口頭+ポスターハイブリッド形式、名古屋 (名古屋国際会議場白鳥ホール、名古屋市熱田区熱田西町) 2009年6月18日~19日
16. 片山新太、馬場大輔、吉田奈央子、葉麗珍、井上康 (2007) ポリ塩化ビフェニル汚染土壤の嫌気微生物を用いた浄化、資源・素材 2007 (名古屋) 名古屋大学、2007 年 9 月 25 日~27 日 (企画 C5 土壤・地下水汚染とその修復技術)
17. 片山新太、楊素銀、吉田奈央子、柴田敦司、馬場大輔 (2008) 嫌気性条件での芳香族塩素化合物の微生物分解、日本農芸化学会中部支部第 153 回例会、名古屋大学 シンポジオン、2008 年 11 月 1 日 (シンポジウム「無酸素下で働く微生物—嫌気性菌の世界 ~環境と健康の視点から~」)
18. 片山新太、柴田敦司、馬場大輔、楊素銀、吉田奈央子 (2008) 水田土壌由来の嫌気微生物群による多様な芳香族化合物の分解、第 24 回微生物生態学会、北海道大学、2008 年 11 月 25 日~28 日 (シンポジウム「嫌気性微生物の応用に関する最近の話題」)
19. Inoue, Y, Torii, K, and Katayama, A. (2007) Modification of filtration theory for transport and deposition of kaolinite in porous media, 2007 GSA Denver Annual Meeting (28–31 October 2007), Denver, Colorado, USA (GSA: Geological Society of America)
20. Daisuke Baba, Hiroshi Okumura, Arata Katayama (2007) Microbial anaerobic degradation of polychlorinated biphenyls in the culture containing burnt inorganic materials, International Symposium on EcoTopia Sciences 2007,

Nagoya University, Nagoya, 23-25 Nov. 2007

21. Yasushi Inoue, Kazuya Shimada, Arata Katayama (2007) Correlation between bacteria and soil particles transported from packed river sand, International Symposium on EcoTopia Sciences 2007, Nagoya University, Nagoya, 23-25 Nov. 2007.
22. Suyin Yang, Atsushi Shibata, Naoko Yoshida and Arata Katayama (2007) Anaerobic degradation of phenol by enrichment cultures under sulfate- and iron-reducing conditions, International Symposium on EcoTopia Sciences 2007, Nagoya University, Nagoya, 23-25 Nov. 2007.
23. Song, D., Kitamura, M., Katayama, A. (2007.11) Relationship between substrate-induced respiration rate and respiratory quinone amount in hydrocarbon-contaminated subsurface soil. International Symposium on EcoTopia Sciences 2007, Nagoya University, Nagoya Japan, 23-25 Nov. 2007.
24. Naoko Yoshida, Lyzhen Ye, Arata Katayama (2008) Novel *Dehalobacter* species dechlorinating polychlorinated biphenyls and dibenzop-dioxins obtained from a culture enriched with 4,5,6,7- tetrachlorophthalide, The 21st Century COE !Center of Excellence" Program The 8th International Symposium on "Global Renaissance by Green Energy Revolution" January 22-23, 2008, Hotel New Otani Nagaoka, Nagaoka, Japan
25. Suyin Yang, Atsushi Shibata, Naoko Yoshida, Arata Katayama (2008) Enrichment and characterization of anaerobic phenol or 4-CP-degrading cultures, XXth Jubilee National, VIIIth International conference, Water Supply and Water Quality 2008, in Gniezno, Poland, 15-18 of June 2008.
26. Katayama, A., Yoshida, N., and Baba D. (2008) Anaerobic dechlorination of polychlorinated biphenyls by the cultures enriched from paddy fields, Sixth International Conference Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, Monterey, California, USA, 19th-22nd May 2008
27. Yuki Shimojo, Y. Inoue, A. Katayama (2008) Development of Two-Region, Three-Site Model for Bacterial Transport in Saturated Porous Media、国際会議第5回「環境汚染におけるコロイド界面現象と界面科学の取り組み」The 5th International Conference "INTERFACES AGAINST POLLUTION"京都（京都大学時計台記念館）2008年6月1日～4日
28. Yoshida, N., Ye, L., Katayama, A. (2008) Novel *Dehalobacter* sp. that obligately grows by the dechlorination of diverse chlorinated aromatic compounds – The dechlorinating bacteria living in paddy field (oral presentation), The 12th International Symposium on Microbial Ecology, Microbial Diversity – Sustaining the Blue Planet, Cairns, Australia, 17th-22nd August, 2008.
29. Yang, S., Shibata, A., Yoshida, N., and Katayama, A. (2008) Complete mineralization of pentachlorophenol by combined anaerobic microbial population (poster presentation) , The 12th International Symposium on Microbial Ecology, Microbial Diversity – Sustaining the Blue Planet, Cairns, Australia, 17th-22nd August, 2008.
30. Truong, H. T., Inoue, Y. and Katayama, A. (2008) Modeling Surfactant-Enhanced Bioremediation of Residual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Saturated Porous Media, HydroPredict 2008, International interdisciplinary conference on Prediction for hydrology, ecology and water resources management using data and models to benefit society, Tristar Hotel, Prague, Czech Republic, 15-18th September 2009
31. Katayama, A., Yoshida, N., Baba, D., and Shibata, A., (2007.10) Characteristics of anaerobic microorganisms degrading persistent organic chemicals in paddy soil, Proceedings of 3rd International Symposium on Pesticide and Environmental Safety & 7th International workshop on crop protection chemistry and regulatory harmonization, October 9-13, 2007, Beijing, PR China, China Agricultural University Press, Ed by Jiang Shuren, Kenneth D. Racke, 147-148, 531pp.

32. Katayama, A. (2008.3) Passive bioremediation technologies for contaminated soil, water, sediments and groundwater, The First China-Japan Science Forum on Environmental Changes, Bio-resources, and Global Warming and Academia Summit on Strategies for Building Research Networks in East Asia, Session 3: Sustainable management of water resource, March 6, 2008, Unicenter, Beijing

事前評価書

作成日		平成18年11月2日
1. 事業名称 (コード番号)	微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発	
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術開発部	
3. 事業概要	<p>(1) 概要：従来の化学・食品産業等における活性汚泥法等の産業廃水・廃棄物等処理技術は、エネルギー多消費型・廃棄物多排出型であり、これまで省エネルギー等の効率化を追究すべく様々な工学的アプローチがなされてきたものの、頭打ち状態である。これは、微生物群の処理メカニズムについては、依然としてブラックボックスのままであり、自然の摂理の域を出ていないことによる。そこで、本プロジェクトでは、活性汚泥法、メタン発酵法等の抜本的な改善を図るべく、我が国の微生物のゲノム解析技術や複合微生物系研究開発等の進展を踏まえ、微生物群の機能を最大限発揮するため、微生物群の構成や配置等を人為的に制御する技術を開発することにより、省エネルギー効果が大きく、廃棄物を大幅に削減する高効率型廃水・廃棄物等処理の基盤技術を開発する。本技術の最終目標は以下の通りとする。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・平成23年度において、活性汚泥法、メタン発酵等の各処理技術における処理効率を従来型の標準的な廃水・廃棄物処理効率の3倍程度向上。 ・処理効率が3倍程度向上することより、そのエネルギー消費量を約70%、汚泥の発生量を約70%削減。 <p>(2) 事業規模：総事業費（国費分） 10億円（100%委託） (3) 事業期間：平成19年度～23年度（5年間）</p>	
4. 評価の検討状況		
<p>(1) 事業の位置付け・必要性</p> <p>環境負荷の低減と省エネルギー化の促進による循環型産業社会の構築は、我が国が取り組むべき火急の課題である。そのためには物質生産プロセスとその後処理の両面における技術開発が必要であり、後処理においては、第3期科学技術基本計画（平成18年3月制定）における重点推進4分野の一つであるライフサイエンス分野において、「生物機能を活用した環境対応技術開発」が重要な研究開発課題として位置付けられる等、生物機能を活用した廃水、廃棄物等の処理技術の高効率・高度化が求められている。</p> <p>従来の廃水・廃棄物等処理技術は、エネルギー多消費型・廃棄物多排出型であって、これまで様々な工学的アプローチによる高度化はなされてきたものの、微生物群自体については、依然としてブラックボックスのまま扱われてきた。</p> <p>本プロジェクトでは、廃水、廃棄物や汚染物質等の処理等のいわゆる静脈産業においても、最新のバイオテクノロジーを応用し、技術的革新を創出することで、高効率処理技術を開発し、省エネルギーで廃棄物を大幅に削減する環境調和型の静脈産業の創出を図る。</p> <p>グリーンバイオ分野の技術戦略マップにおいて「生物機能を活用した環境維持・修復技術」の中で排出源での効率的な処理における「微生物間相互作用の検出・応用技術」、「高効率微生物集団デザイン化技術」等に位置付けられている。</p>		

(2) 研究開発目標の妥当性

(目標)

- ① 従来の標準的廃水処理やメタン発酵プロセスの3倍程度の超高効率化を図る。
- ② 処理プロセスでのエネルギー使用量の約70%削減。
- ③ 汚泥の発生量の約70%削減。

(妥当性)

- ① 集団を構成する微生物群の機能が効率的に発現するためのデザイン化技術を次の通り開発することにより、従来の廃水処理やメタン発酵プロセスの3倍程度の高効率化を図る。また、海外では現在、微生物群のデザイン化技術の開発に取り組んでおらず、日本発のオリジナル技術の開発となり得る。
 - ・ 構成微生物群に対し、その相互関係の解析・把握に基づき、特定有用微生物を安定的に導入・強化する技術、特定有害微生物を除去する技術の開発。
 - ・ 微生物と固体表面との相互作用及び微生物間の相互作用の解析・把握に基づき、特定有用微生物群を安定的に維持・空間的に配置する技術の開発。
 - ・ さらに、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の開発。
- ② 従来の活性汚泥法の3倍程度の処理効率化を図ることにより、処理プロセスでのエネルギー使用量の約70%の削減、並びに汚泥の発生量の約70%削減を図る。
- ③ 従来のメタン発酵法の3倍程度の超高効率化を図ることにより、リアクタの大幅なコンパクト化等システム効率の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物種への適用を可能とする。

(3) 研究開発マネジメント

公募を行い最適な研究体制を構築する。各研究開発課題は密接に連携を取る。プロジェクト開始後3年目に中間評価を予定しており、その評価結果を踏まえて事業全体について見直しを行うことを想定している。

また、NEDOにおいては環境技術開発部など関連する推進部のプロジェクトとの成果の共有や相互活用、さらには相乗効果を計るため、プロジェクト関係者や各種委員会の外部有識者が相互に委員会参加等の連携も検討する。

(4) 研究開発成果

国内の廃水処理施設の多くは、ここ10年の内に一斉に耐用年数に達し、更新の時期に当たるとされる。現在、廃水処理市場は、1.5兆円の規模であるが、今後、拡大が期待される。本事業の研究開発成果により革新的技術が創出されれば、この技術が導入される可能性が極めて高く、さらなる市場の発展が期待される。

また、本技術により、省エネ効果が期待される。例えば活性汚泥法を例にとれば、2030年で石油換算20.5万k1/年(各成功率10%を乗じた値)が見込まれる。これは我が国の活性汚泥法に使用される電力量は、日本全体の一般の電力需要の約1.9%をも占めるためであり、本技術開発による省エネ効果(約70%)のインパクトは極めて大きい。

メタン発酵についても、未利用食品残さ1,760万トン^{*1}を対象とした場合、現行の焼却法に比して、高効率メタン発酵を適用すれば石油換算17.8万k1/年(各成功率10%を乗じた値)の省エネ効果が見込まれる。

<p>(5) 実用化・事業化の見通し</p> <p>開発する技術は主に、有機物濃度の低い廃水から、有機物が高濃度に含まれ難分解性物質も含有する産業(工場)廃水等を適用対象とする。このように開発する技術は、前述のように、例えば、廃水・廃棄物処理施設に導入可能であり、産業廃水処理、廃棄物処理としての新規なコア技術として事業化が可能である。</p>
<p>(6) その他特記事項</p>
<p>5. 総合評価</p> <p>本事業は、従来ブラックボックスとして取り扱われてきた各種微生物群(活性汚泥、メタン発酵汚泥等)に対し、その構成及びその空間配置を人為的に制御・設計することにより、集団としての機能を高めることで、廃水・廃棄物等の新規な高効率処理技術体系を構築するという、世界でもこれまでに組みのない日本発のオリジナル技術開発である。</p> <p>処理対象や開発すべき各種要素技術が多岐に亘り、産学官連携体制での実施が望まれることから、NEDO主導で実施すべき事業である。</p>

(注) 事業の全体像がわかる図表を添付すること。

※1 出典『バイオマス・ニッポン総合戦略』2006年3月閣議決定より