

「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」
(事後評価)第1回分科会
資料5

「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・医療技術部
-----	--

—目次—

概要

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…………… I-1
 - 1.1 NEDOが関与することの意義
 - 1.2 実施の効果(費用対効果)
2. 事業の背景・目的・位置づけ…………… I-2

II. 研究開発マネジメントについて

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

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果…………… III-1
2. 研究開発項目毎の成果…………… III-2

IV. 実用化の見通しについて

- 実用化の見通しについて…………… IV

(添付資料)

- ・イノベーションプログラム基本計画
- ・プロジェクト基本計画
- ・事前評価関連資料(事前評価書)
- ・特許論文リスト

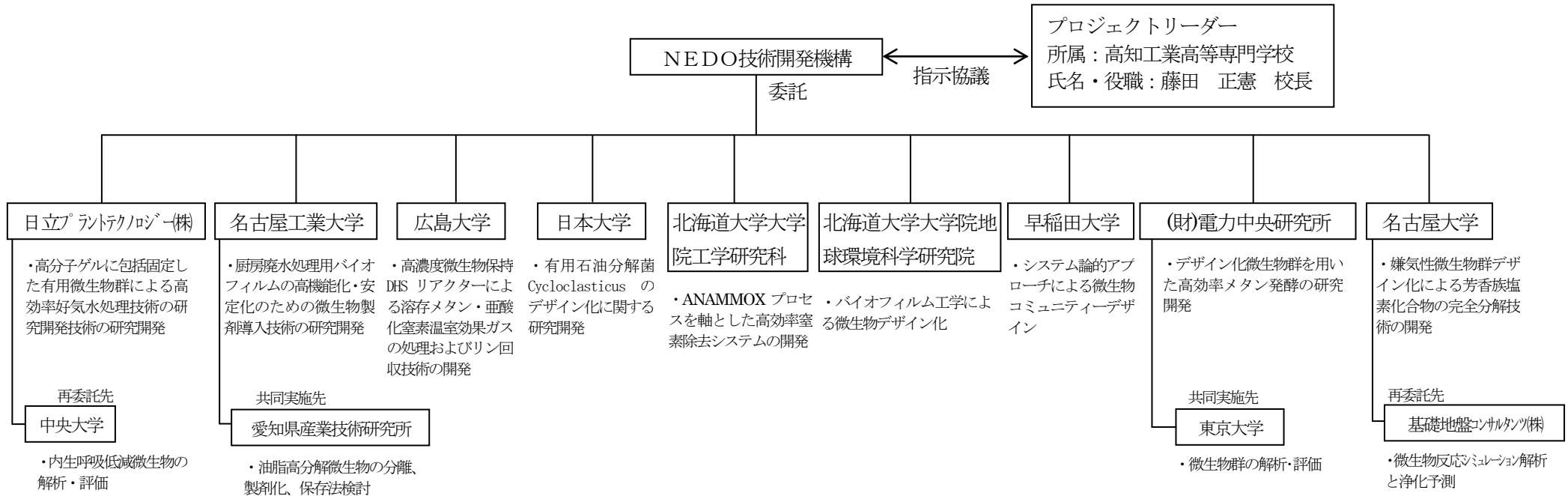
概要

作成日 平成24年4月

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・医療技術部 主査 長谷川 義基(H.21年度から事後評価まで)						
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、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>「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、「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						→

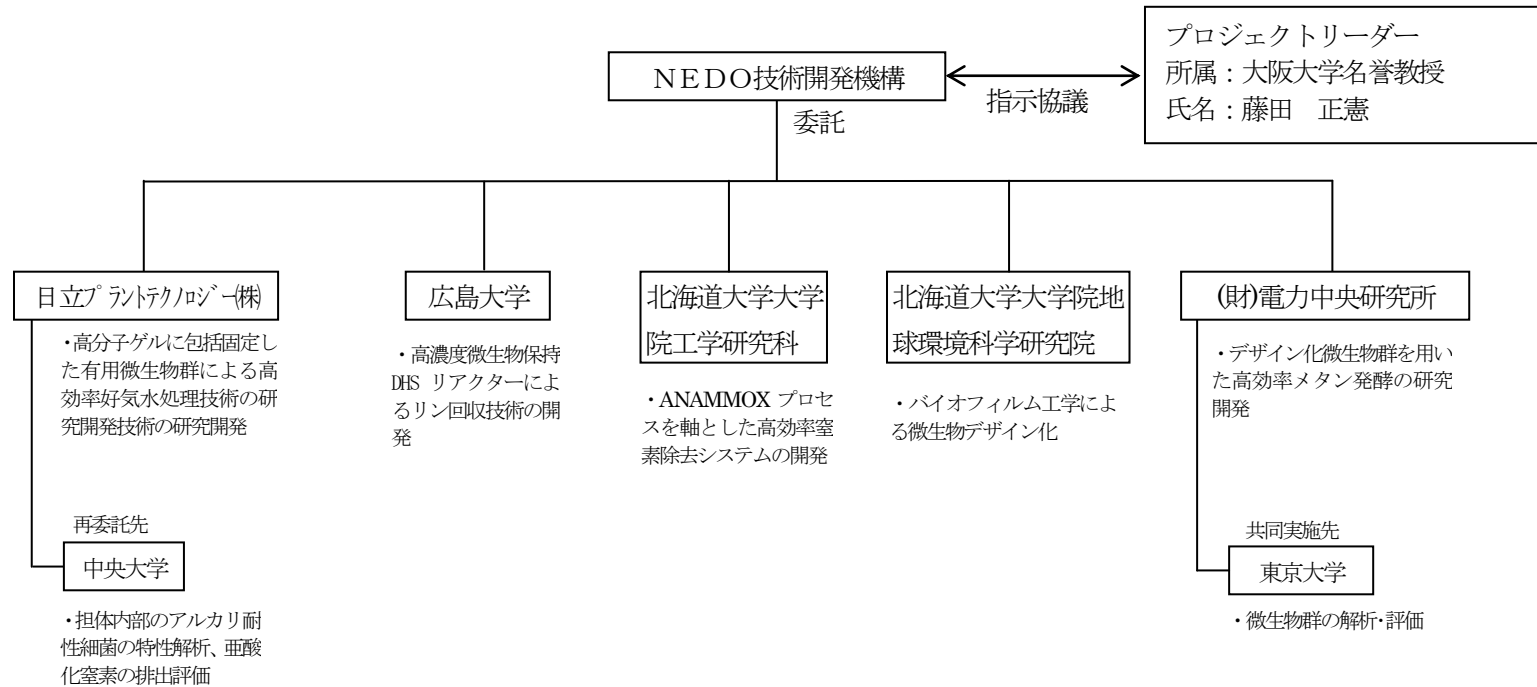
開発予算 (会計・勘定別に事業費の実績額を記載) (単位:百万円)	会計・勘定	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	H23fy	総額
	特別会計(需給)	188	154	114	73	101	630
	加速予算		38	57	35		130
	総予算額	188	192	171	108	101	760
開発体制	経産省担当原課	製造産業局生物化学産業課					
	プロジェクトリーダー	藤田正憲 大阪大学名誉教授					
	委託先(*委託先が管理法人の場合は参加企業数も記載)	[全期間](株)日立プラントテクノロジー, 広島大院工学研究科, 北海道大院工学研究院, 北海道大院地球環境科学研究所, (財)電力中央研究所 [~H21fy]名古屋工業大院工学研究科, 日本大生物資源科学部, 早稲田大ナノ理工学研究機構, 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。また、中間評価後に実施体制を変更した。						
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 曝気量とメタノール添加量の削減需要が見込まれる消化汚泥脱水ろ液、産業排水処理に向けて、硝酸化抑制技術を用いた窒素除去システムを開発した。 実下水を用いてリン除去・回収 DHS リアクターの開発を行った。 バイオフィルム工学による活性汚泥法の効率化・安定化を目指し、具体的には硝化槽の性能の鍵となるアンモニア酸化細菌および Anammox 菌についてその特性をバイオフィルム形成の点から理解し、バイオフィルム形成による安定化を行った。 [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)、広島大学大学院工学研究科、北海道大学大学院地球環境科学研究所]</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 Anammox プロセスについて最適条件の検討、Anammox 細菌のメタゲノム解析を行った。 固定床(担体)メタン発酵による安定化と電気による微生物群の制御技術の開発、およびこれらの組合せによる効率的なメタン発酵処理技術の開発を行った。 [実施体制: 北海道大学工学研究科、電力中央研究所(共同実施: 東京大学)]</p>						
	投稿論文	論文発表 47 件、口頭発表 148 件、新聞・プレス・受賞等 12 件					
	特許	「出願済」7 件(内外国出願 0 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推進に取り組んだ。					
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 24 年度 事後評価実施					
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 研究開発の目的」の記載を改訂					
		22 年 3 月 変更 研究開発の目標を改訂					
		23 年 7 月 根拠法を改訂					

「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（平成 19-21 年度）



(別紙) 本事業の実施体制図

「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 (平成 22-23 年度)



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。
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。
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。

有機物負荷量(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で、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
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。
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、細胞膜を破碎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)微生物細胞群が形成する高次構造体。細胞は多糖類や核酸などの生体高分子物質に覆われ、物理的・化学的・生物学的に高いストレス耐性を獲得する。バイオフィーム内では微生物間相互作用が頻繁におこるため、浮遊細胞とは異なったさまざまな特徴が発現する。
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、いま純粹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。この細菌数を減ずる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。
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
FISH法	Fluorescence in situ hybridizationの略。蛍光標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行い、顕微鏡下で特定の微生物細胞をそのrRNA遺伝子の配列情報特異的に検出する。

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した。

平成21年度までは以下により実施した。

- 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

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
- 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) バイオフィー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

平成22年度以降は以下により実施した。

- 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

下記研究開発テーマ：1)、2)及び3)が該当する。

- 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

下記研究開発テーマ：4)及び5)が該当する。

- 1) 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) 高濃度微生物保持DHSリアクターによるリン回収技術の開発
- 3) 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
- 4) 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
- 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

2.2 研究開発の実施体制

本事業は、(委託先が平成21年度までは9機関、この他に大学等と共同研究または再委託研究)平成22年度からは5機関、この他に中央大学、東京大学との共同研究または再委託研究で実施した(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した。具体的には、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を行った。

3. 情勢変化への対応

国内外の関連の学会などに参加、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た。

4. 中間評価結果への対応

平成21年度に中間評価を行い、結果は概ね良好であった。
平成22年度より実施体制の変更を行った。

4. 中間評価結果への対応

4.1 日立プラントテクノロジー

中間評価時のコメント

- 1) 微生物デザイン化により曝気量 1/3 にすること
- 2) 包括固定をすることにより、基質供給律速等が生じて内生呼吸が益してしまうことは生じないか
- 3) エネルギー消費量 2/3 を目標とする場合、どの技術の組み合わせにより、2/3 が達成できるか、組み合わせ例を示すこと。CO₂削減量、汚泥排出量削減・処分まで想定しての試算

1) 本研究開発では、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 の削減を目標としている。そうした中、当初、日立プラントテクノロジーでは内生呼吸低減菌を探索し、それらをゲル担体内へ包括固定化することにより、活性汚泥による BOD 酸化で課題となっている内生呼吸を、約 1/3 に低減することを目標に研究を行ってまいりました。しかしながら、近年の廃水処理は、BOD 除去に加え窒素除去も主流になりつつあることを踏まえ、内生呼吸低減菌の保持方法の検討に用いた亜硝酸型硝化技術による酸素供給量低減化をアナモックス技術等と合わせた状態でのエネルギー削減を目指した。

2) 内生呼吸に係わらず、微生物の包括固定化により基質供給律速等が生じた場合、処理の効率化が低下することは明確である。しかしながら、微生物は馴養することで担体表面に最適な微生物フローラを自らデザインすることが確認されており、本研究開発では、そこへ更に pH ショックという人為的な影響を更に及ぼすことによって、基質の最適な消費を促した。

3) 各機関の連携を図り、亜硝酸型硝化とアナモックスとメタン発酵を組み合わせたプラントを想定し、検討した。すなわち、メタン発酵部（電中研担当）では容積 50% コンパクト化を目指し、亜硝酸型硝化（日立プラント、北大（地）担当）及びアナモックス（北大（工）担当）による窒素処理部では活性汚泥を用いた廃水処理のエネルギー消費量 2/3 を目指した。尚、本研究開発項目「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開発」では、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、を目標としておりますが、標準活性汚泥法では窒素処理を目的としていないため、ここでは、窒素処理が可能な活性汚泥プロセス全体に対するエネルギー使用量の約 2/3 の削減を目標とした。

4.2 広島大学

中間評価時のコメント 1

DHS リアクターによる研究開発では純粋基質が用いられてきたが、実排水には有機物質、浮遊物質その他多種類の物質が含有する。特に、メタン発酵消化液はメタンのほか高濃度有機物を含有し、DHS リアクターの目詰まりや他の障害をもたらすので、本プロセスの適用の可能な、実排水の性状についても明らかにするべきである。

<回答 1>

本研究は、排水処理水からのリン回収を目的としており、消化液は対象にしていない。当初の予定通り、実排水を使用して実証試験を行った。リン含有排水には UASB-DHS システム通過後の処理水を用いた。有機性排水には酢酸ナトリウムおよびプロピオン酸ナトリウムで調整した人工基質を用いた。なお、初沈汚泥の酸発酵については、室内実験で条件検討を行った。

中間評価時のコメント 2

DHS リアクターの実用化により、溶存メタンの酸化分解・亜酸化窒素の分解除去が可能になり、CO₂ 排出量を大幅に削減できるので、最終目標に温室効果ガス削減効果を追記することが望まれる。

<回答 2>

それぞれについて CO₂ 排出量の算出を行い、以下の削減数値が得られた。(a) DHS リアクターによる溶存メタン酸化分解：密閉型 DHS の導入で CO₂ 排出量 1/6 以下に削減、(b) 亜酸化窒素ガス分解 DHS リアクターの開発：DHS の導入で CO₂ 排出量 1/4～1/9 以下に削減、(c) リン除去・回収 DHS リアクターの開発：密閉型 DHS の導入でリン回収費用 1/3 以下に削減

4.3 北海道大学地球環境科学研究所

中間評価時のコメント		対応
1	<p>研究開発成果について</p> <p>バイオフィルム工学で解決すべき課題の大きさが不明瞭である。取り上げたサブテーマは環境問題ではあるが、規模感や緊急性の説明が少なく、バイオフィルム工学が解決手段としてなぜ優れるのかという仮説提案がなされていないように思う。</p>	<p>掘削除去により積み上げられた汚染土壌(ブラウンフィールド)は平成20年度現在2.8万ヘクタール土地資産価値10.8兆円と見積もられている。その原位置浄化に有効な微生物投入による土壌修復技術のコストを押し上げる主要因が微生物定着性の低さにある。一方、バイオフィルムとは生体高分子に包まれた微生物の付着凝集体を指し、いわゆるシェルターのような役割をもつため、バイレメ従来法で用いられる浮遊・分散細胞に比べて環境耐性が格段に高く、定着性および活性の持続性に優れる。バイオフィルム工学とはこのような特徴を活用する技術全般を指す。中間評価以降では硝化菌についても、バイオフィルム工学の有効性も証明した。</p>
2	<p>実用化の見通しについて</p> <p>バイオフィルム工学によるデザイン化については、普及の対象とするフィールドの適切なスケールダウンがなされているのかをまず検証すべきと思われる。</p>	<p>微生物群デザイン化技術開発のためには、まだブラックボックスの域を出ていない活性汚泥内における複雑な微生物群相互作用の演繹的理解が不可欠と考えている。すなわち本研究項目では、モデル系を再構築しつつ汎用的に有効な基本技術や指針の開発を目指している。指摘に従い、対象とする細菌群は全て現場から単離されたものを使い、現場環境を出来る限り反映するよう配慮した。</p>

4.4 北海道大学工学研究院

中間評価時のコメント

1. 部分硝化を組み合わせた脱窒システムについて

将来的には、高速アナモックスリアクターと、亜硝酸生成のための部分硝化装置とを組み合わせたシステムを考えられていると思いますが、組み合わせたシステムとしての、エネルギー削減、容積コンパクト化についてデータ、もしくは試算すること。

対応

部分消化リアクターの亜硝酸生成速度は $1.2 \text{ kg-TN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ 、一方、Anammox プロセスによる窒素除去速度は平均で $20 \text{ kg-TN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ である。もし、部分消化リアクターで流入 NH_4^+ を 100% 亜硝酸に変換した場合、Anammox リアクターへの流入窒素負荷は最大で、 $2.4 \text{ kg-TN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (部分消化リアクターの処理水と原水を同負荷で Anammox リアクターに流入する) となり、Anammox リアクターの高い能力を生かせない。従って、部分消化リアクターと Anammox リアクターの体積比を 8 : 1 もしくは 5 : 1 ぐらいに設定する必要がある。この条件を考慮したリアクター設定とした。

本プロセスの問題は、やはり部分消化速度の高速化であり、これを達成するために、アンモニア酸化細菌の高密度集積化 (リアクタータイプの検討)、効率的なばっ気方法の確立、などを検討した。エネルギー削減の観点からは、酸素曝気に要するコスト・エネルギーが最大で 62%、外部炭素源の供給は 100%、余剰汚泥の発生量も大幅に削減できる。これに、汚泥処理に要するコスト・エネルギーを考慮に入れると、さらなる削減が見込まれる。従って、従来の活性汚泥法に比べて大幅にランニングコストを削減できる新規省エネ型窒素除去プロセスの構築が可能となると考える。しかし、これは試算であり、実際の実験データを取る必要があると考える。

4.5 電力中央研究所

番号	中間評価時のコメント	対応
1	<p>嫌気性細菌によるメタン発酵及び芳香族塩素化合物の嫌気性処理技術は、地球温暖化防止・循環型社会の形成に大きく貢献するものであり、中間目標に向かって鋭意研究開発が進められている。特に、メタン発酵の酸化還元電位制御に着目して試験を行ったことは興味深く、単純化されたテーブルスケールだが再現性のある結果が得られている。また、芳香族塩素化合物の微生物分解の一貫嫌気分解技術開発は処理コスト低減に貢献し意義深い。</p> <p>しかし、<u>デザイン化微生物群担体に通電することにより、酸化還元電位が最適に維持され、メタン発酵の高効率化が得られた研究成果については、加水分解細菌、酸生成細菌及びメタン生成古細菌から構成される原核微生物群集が何故どのような理論で、基質の有機物の物質分解を高速に行うことが可能となるのか明確にして欲しい。</u></p>	<p>担体に通電することによる主な効果は、担体近傍の酸化還元状態を調節し、担体の微生物およびその活性を維持する効果であるという考えを明確にした。</p>
2	<p>芳香族塩素化合物の微生物分解は、目標とする好気微生物技術と同等の処理速度を達成し、これに基づく概算のF/Sが実施されており、早期の実用化が期待される。</p> <p><u>酸化還元電位によるメタン発酵の高効率化については、固形物濃度が低く、メタン発酵微生物が過度に増えない処理系への適用が期待できるので、先ずはこのプロセスをターゲットに実液の原水を用い、パイロット規模での長期期間試験を行い、実用化のイメージを明らかにしていくことが望まれる。</u></p> <p><u>電荷チャージを前提とする技法は固定床を選択せざるを得ないとすると、実用プロセスの適用範囲に制限</u></p>	<p>当初の対象が固形分の多い未利用廃棄物であるため、濃縮下水汚泥を用い、実用化のイメージを明らかにしていくための実証を実施した。</p> <p>本研究開発の提案において、未利用分食品残渣などの10%をメタン発酵にリプレースすることを仮定している。</p>

	<p><u>が生じるであろうが、将来、リプレイス可能な嫌気処理の対象は具体的に何で、嫌気処理プロセスの何割を占めるのか普及対象について仮説提案して欲しい。</u></p>	
3	<p>微生物反応のブラックボックスから脱却することが本プロジェクトの狙いなので、メカニズムの解明は特に大切である。得られた知見の理論化・再整理が充実していけば、世界最高水準の技術に育つであろう。</p> <p>芳香族塩素化合物の嫌氣的分解・原位置処理技術は産業界としてリスク管理面の有用性が非常に高い技術であり、技術開発の加速を期待する。</p> <p>各研究課題が掲げている最終目標はかなりハードルの高いものであるが、5年間という余裕ある研究期間が与えられており、基礎的研究を含めて実用化に至るまでの徹底した研究を完成する好機である。しかも、NEDOの研究目的に叶っており、地球環境保全と循環型社会の形成のために大きく貢献できる日本発の技術なので、是非ともプロジェクトリーダーの下に世界初の環境バイオ処理技術を創造して欲しい。</p>	

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年度に実施し、事後評価を平成24年度に実施。また、前述のとおり、中間評価結果を踏まえ、プロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを行った。

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、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

[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）、広島大学大学院工学研究科、北海道大学大学院地球環境科学研究院]

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

[実施体制：北海道大学大学院工学研究院、電力中央研究所（共同実施：東京大学）]

個々の成果は以下のとおり。

Ⅲ.1.1

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

目標	研究開発成果	達成度
内生呼吸低減菌の探索 (内生呼吸 10%低減)	内生呼吸低減菌の取得 (内生呼吸最大 40%低減)	大幅に達成
内生呼吸の評価手法の検討	GC-QMS による内生呼吸計測方法を確立 基質の有り無しにおける内生呼吸の比較を可能にした。	大幅に達成
内生呼吸低減菌フローラの固定化	取得した内生呼吸低減菌を包括固定化し、pHショック (pH13、1h) に耐えられることを実証。コンタミ系である実排水処理への適用の可能性を見出した。	達成
亜硝酸型硝化の検討	合成廃水処理系において、不要な亜硝酸酸化細菌の不活性化条件を確認した。	大幅に達成
亜硝酸型硝化反応の実証運転 (酸素消費量約 25%低減) 安定した硝化率制御 (硝化率 57%)	N ₂ O 生成抑制による亜硝酸型硝化を実排水処理において実証 (酸素消費量約 25%低減) 消化脱水ろ液の亜硝酸型硝化においてアンモニアセンサーを用いたDO制御による硝化率制御を実証 (硝化率 57%)	大幅に達成 大幅に達成
担体菌叢解析	ユニバーサルプライマ等を用いたクローンライブラリを作製。pH ショック前後での担体内菌叢解析を行い、亜硝酸酸化細菌 Nitrospira 属が消失や Nitrosomonas 属の生存を確認。	大幅に達成
亜酸化窒素排出量の解析 (温室効果ガスの抑制)	pH ショックによる亜酸化窒素発生の抑制効果を確認	大幅に達成

Ⅲ. 1. 2

広島大学

目標	研究開発成果	達成度
<p>(a) DHS リアクターによる溶存メタン酸化分解</p> <p>メタン除去率 90%以上を HRT2 時間で達成する [H20, H21]</p> <p>CO₂ 排出量 1/3 以下に削減</p> <p>H22 年度以降中止</p>	<p>嫌気処理排水を模擬した溶存メタン・アンモニア・硫黄・有機物（酢酸）含有人工排水に対して、HRT2 時間、空気供給量 3.88 kg-O₂·m⁻³·day⁻¹において、メタン除去率 90%以上を達成</p> <p>密閉型 DHS の導入で CO₂ 排出量 1/6 以下に削減</p> <p>(理由) リン除去・回収の研究開発を強化するため</p>	<p>達成</p> <p>達成可能</p>
<p>(b) 亜酸化窒素ガス分解 DHS リアクターの開発</p> <p>好気条件下での亜酸化窒素の酸化分解の進行の確認 [H20, H21]</p> <p>嫌気条件下でのメタンを炭素源とした亜酸化窒素の還元除去(脱窒)の進行の確認 [H20, H21]</p> <p>CO₂ 排出量 1/3 以下に削減</p> <p>H22 年度以降中止</p>	<p>亜酸化窒素の酸化分解が継続的に進行する事を確認</p> <p>嫌気条件下において、メタン酸化と亜酸化窒素の還元が継続的に進行することを確認</p> <p>温室効果ガス・メタンと亜酸化窒素を分解することで、CO₂ 排出量 1/4～1/9 以下に削減</p> <p>(理由) リン除去・回収の研究開発を強化するため</p>	<p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成可能</p>
<p>(c) リン除去・回収 DHS リアクターの開発</p> <p>嫌気・好気時間の検討 [H20, H21]</p> <p>人工排水を用いてリン酸を 100 mg-P·L⁻¹ 以上に濃縮 [H20～22]</p> <p>リン除去・回収率 80%以上を達成 [H20～23]</p> <p>実下水を用いてリン酸を 100 mg-P·L⁻¹ 以上に濃縮 [H22, H23]</p> <p>リン回収費用 1/3 以下に削減</p>	<p>最適なサイクルとして嫌気 4 時間、好気 8 時間を決定</p> <p>流入濃度 5 mg-P·L⁻¹ のリン酸を 158 mg-P·L⁻¹ まで濃縮することに成功</p> <p>担体形状とリアクター運転方法を改善することで、リン除去・回収率 60%以上を達成</p> <p>高濃度硫酸イオン含有 (400～600 mg-SO₄²⁻·L⁻¹) かつ希薄なリン濃度 (1.5 mg-P·L⁻¹) の下水に対して、30 mg-P·L⁻¹ 程度のリン濃縮液を得ることに成功</p> <p>密閉型 DHS の導入でリン回収費用 1/3 以下に削減</p>	<p>達成</p> <p>達成</p> <p>80%</p> <p>達成可能</p> <p>達成</p>

Ⅲ.1.3

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

北海道大学大学院地球環境科学研究院

目標	研究開発成果	達成度
項目 1. バイオフィルム工学による活性汚泥法の効率化・安定化	アンモニア酸化細菌 <i>Nitrosomonas europaea</i> の活性を 2.5 倍向上させるバイオフィルム形成法および共存細菌の取得に成功し、その機構を分子あるいは遺伝子レベルで解明した。Anammox 細菌については、主要膜タンパク質を同定することに成功し、同細菌の生理学的特性理解に貢献した。	達成
バイオフィルム工学による活性汚泥法の効率化・安定化を目指す。具体的には硝化槽の性能の鍵となるアンモニア酸化細菌および Anammox 菌についてその特性をバイオフィルム形成の点から理解し、バイオフィルム形成による安定化を目指す。		
項目 2. バイオフィルム工学による環境浄化技術の効率化・安定化	ナフタレン分解細菌 <i>Pseudomonas stutzeri</i> T102 のバイオフィルムが原油汚染土壌で長期間安定に活性を発現することを実証すると共に、バイオフィルムが高活性細胞を放出し続ける機能を有する現象を初めて明らかにした。	達成
偏在する環境汚染物質として炭化水素類を取り上げ、その分解細菌群の汚染現場への安定的な導入法の技術基盤をバイオフィルム工学の視点から開発する。		
項目 3. 植物との共生関係を利用した炭化水素分解細菌群のデザイン化	アオウキクサよりフェノール分解活性と植物成長促進活性を同時に有する根圏細菌 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> P23 を世界に先駆けて発見した（特許出願済）。また、P23+アオウキクサ（根圏細菌デザイン化植物）が光照射のみで長期間安定にフェノールを分解し続けることおよび浄化後に細菌が回収できることを実証した。	大幅に達成
植物との共生関係を利用した炭化水素分解細菌群のデザイン化および現場への導入法を開発する。		

Ⅲ. 1.4

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 北海道大学大学院工学研究院

目標	研究開発成果	達成度
プロジェクト全体の目標： 嫌気性アンモニア酸化法を軸とした高効率・省エネルギー、低コスト型窒素除去システムを開発する。従来の硝化液循環型活性汚泥法と比較して、10倍以上の窒素除去速度（12 Kg-TN/m ³ /dav）		達成
(1) Anammoxプロセスの最適条件の検討	(1) 二段ステップ流入式上向流バイオフィルムリアクターを構築した。最大窒素除去速度34.2 Kg-TN/m ³ /dを達成した。この値は、従来の硝化-脱窒法と比較して約30倍高い速度である。	達成
(2) 部分硝化プロセスの最適条件の検討	(2) NH ₂ OH（濃度250 μM）を添加することで、迅速かつ安定的な部分消化反応を立ち上げることに成功した。また、好気グラニュール汚泥部分硝化リアクターを構築し、最大部分硝化速度1.25 kgN m ⁻³ day ⁻¹ を達成した。	達成
(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	(3) 部分硝化- Anammox並列型リアクターを作成した。この時のAnammoxリアクターの最大窒素除去速度15.0 Kg-TN/m ³ /dを達成した。	達成
(4) 分子生物学的手法およびマイクロセンサーによる微生物群集解析	(4) 部分消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。源位置における Anammox活性およびN ₂ 、NO生成活性を微小電極で測定した。	達成
(5) Anammox細菌のメタゲノム解析	(5) <i>Ca. B. sinica</i> の完全長に近いゲノム配列の再構築に成功した。プロテオーム解析を行い、新規窒素代謝経路を発見した。	達成
(6) 実廃水を用いた実証試験（Anammoxプロセスのみ）	(6) 実廃水をAnammoxプロセスで処理した。窒素除去速度約6.0 kg-TN m ⁻³ day ⁻¹ を達成した。	達成

Ⅲ.1.5

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

電力中央研究所

目標	研究開発成果	達成度
メタン発酵における微生物群担体の電気制御技術		
メタン発酵において微生物群担体と通電による制御を組み合わせたメタン発酵技術を開発し、生ごみを対象にした既設のメタン処理施設の日平均容積効率の3倍（有機物負荷量：25.5gCOD/L/日）での安定処理および発酵槽設置面積を50%にコンパクト化を実現する。	微生物群担体と通電による制御を組み合わせた通電型固定床メタン発酵槽（容積4L）の実証装置を開発した。	大幅に達成
	模擬生ごみを対象に最大有機物負荷量89.3gCOD/L/日（水理学的滞留時間1.5日）での処理を達成した。	大幅に達成
	濃縮下水汚泥を対象に汚泥提供元設備と比較し、有機物負荷量4.5倍（設置面積：約36%にコンパクト化）での処理を達成した。	大幅に達成

III. 2. 研究開発項目毎の成果

2. 1 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)

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。また、窒素処理においては曝気コストと並び脱窒反応に必要なメタノールコストが重要な課題となっている。

そこで本研究開発では、活性汚泥を構成する微生物フローラに着目した。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や窒素処理において付随的に進行する亜硝酸酸化反応に使用されている。そこでフローラ菌種を人為的に限定し、内生呼吸低減菌やアンモニア酸化細菌群を選択的に廃水処理へ適用させ、不要な細菌群を可能な限り排除することにより、曝気量に対する処理効率向上のための検討を行った。

平成19年度～21年度では、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を目的として、内生呼吸低減菌の探索をし、その内生呼吸低減効果のGC-QMSによる定量方法の開発を行い、得られた有用菌の安定維持方法について検討した。

さらに平成22年度～23年度は、各研究機関の連携を図りメタン発酵部と亜硝酸型硝化とアナモックスからなる窒素処理部をそれぞれ分担し、アンモニア態窒素を含む有機系廃水処理の実証評価を行った。その中で本研究開発は、亜硝酸型硝化に関わる検討を担当し、内生呼吸

低減菌に関わる研究開発から得られた、目的外の微生物を担体から排除する技術を活用した亜硝酸型硝化処理性能を検証した。また、亜硝酸型硝化は、地球温暖化ガスである亜酸化窒素を多く生成させることが懸念されたことから、その発生特性について評価した。

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槽内での、内生呼吸を記述する式を導いた。

H: 水理学的滞留時間 (h)

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

S_{in} : 流入する廃水中の BOD 濃度 (流入基質濃度: $mmol O_2/L$)

$S_{out} = 0$: 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

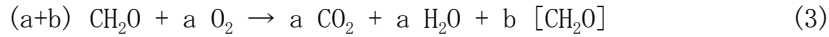
r_1 を呼吸定数 [specific oxygen uptake rate: $mmol$ of oxygen consumed (S) per g dry weight of bacteria (X) per h (t)] とする。また、 S は基質濃度、 K_s は飽和定数とすると:

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

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

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/L)、 $X(t)$ は：

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

但し、 $X(t) \times r_2 > S_{in} \times d$ 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 $[\text{C}(\text{H}_2\text{O}) + \text{O}_2 = \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}]$ 、1 mol の O_2 で、32 g の減量が起こる、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/L) は :

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

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。

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

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

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 :

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

$$X(t) \times r_2 = \{X_{\min} \times r_1 \times [y_1 + (y_1)^2]\} \times \{1 - [1 / \exp(r_2 \times y_2 \times t)]\} / Y_2 + [(X_0 \times r_2) / \exp(r_2 \times y_2 \times t)] \quad (26)$$

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。

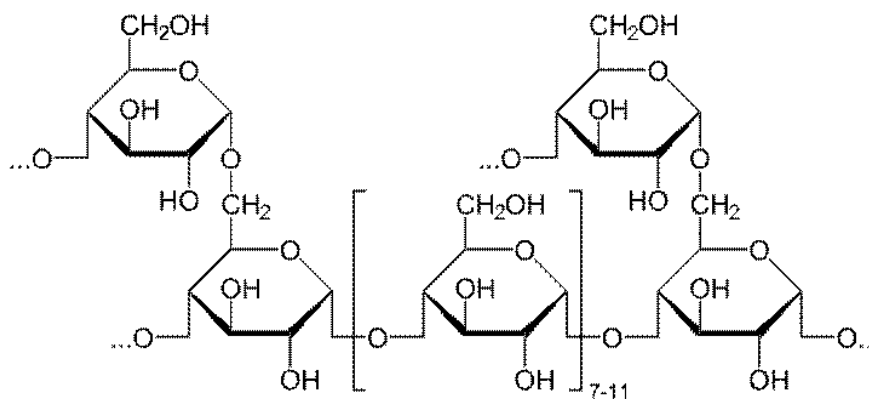


図1 グリコーゲンの構造

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)



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)。

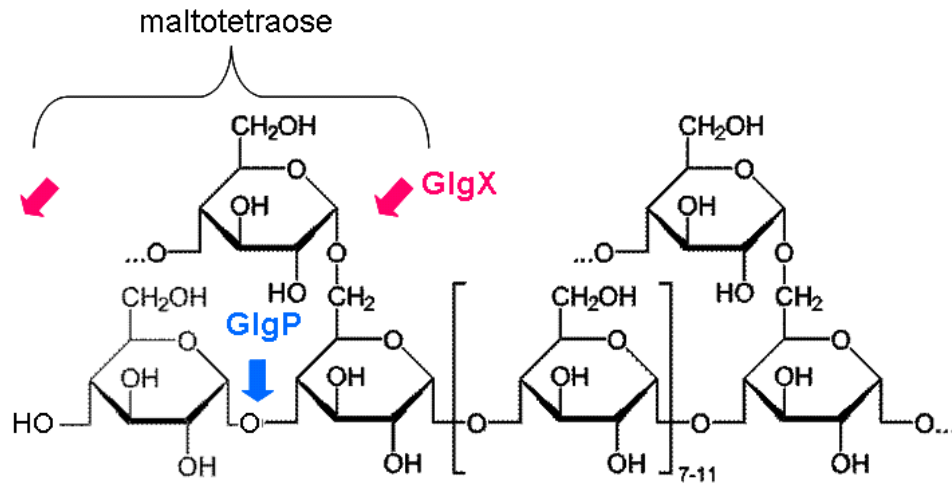
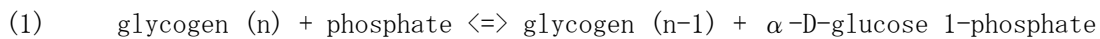
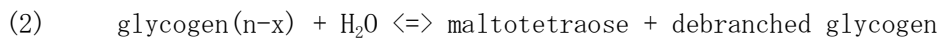


図2 グリコーゲン分解に関する酵素の作用箇所

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	rrnB3 Δ lacZ4787 hsdR514 Δ (araBAD)567 Δ (rhaBAD)568 rph-1
JW1279	BW25113 <i>rnb</i>	defective in RNase II
JW0603	BW25113 <i>rna</i>	defective in RNase I
JW2263	BW25113 <i>elaC</i>	defective in RNase BN
JW3216	BW25113 <i>rng</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- \rightarrow 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 h 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場合があるが、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場合があるが、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。

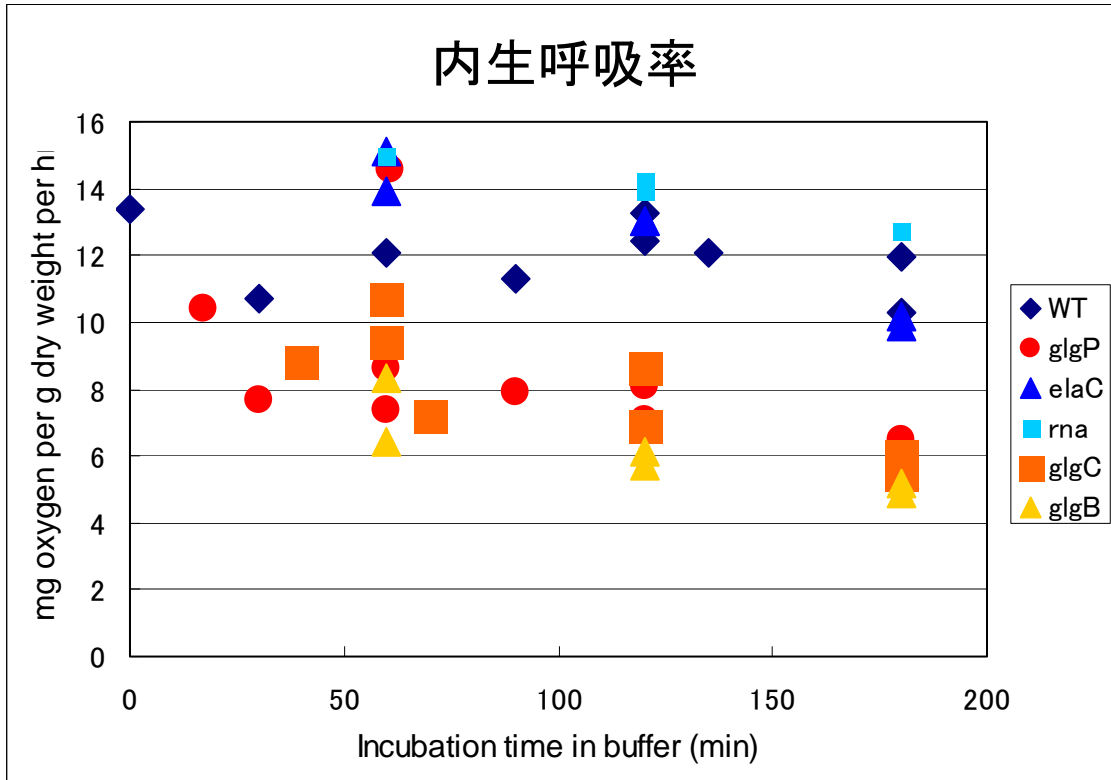


図3 大腸菌の内生呼吸 (WT: 野生型、突然変異体については、表1を参照)

		Endogenous respiration (mg oxygen per g dry weight per h)		
Strain	Defect	Mean	Standard Deviation	% to WT
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>rna</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）。

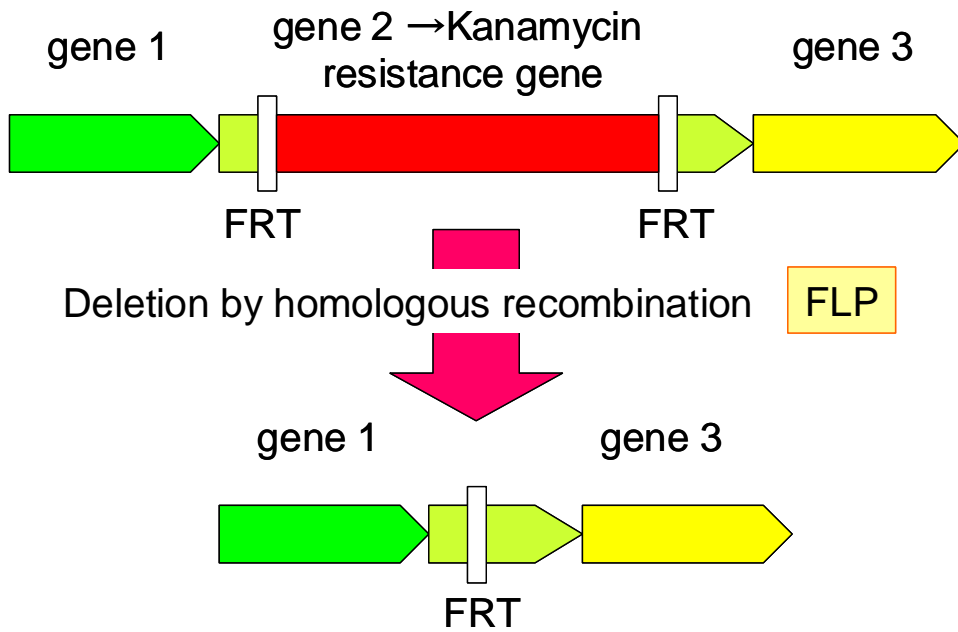


図 4 FLP リコンビナーゼを用いたカナマイシン耐性遺伝子の除去

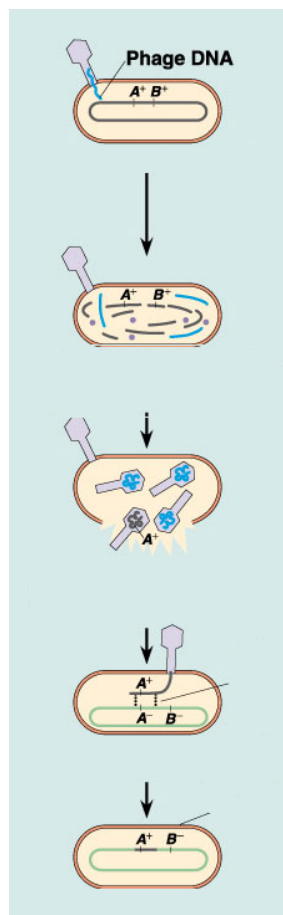


図 5 P1 ファージを用いた形質導入 (transduction)

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・ライセートを持ちいて 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。

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 rna* 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。

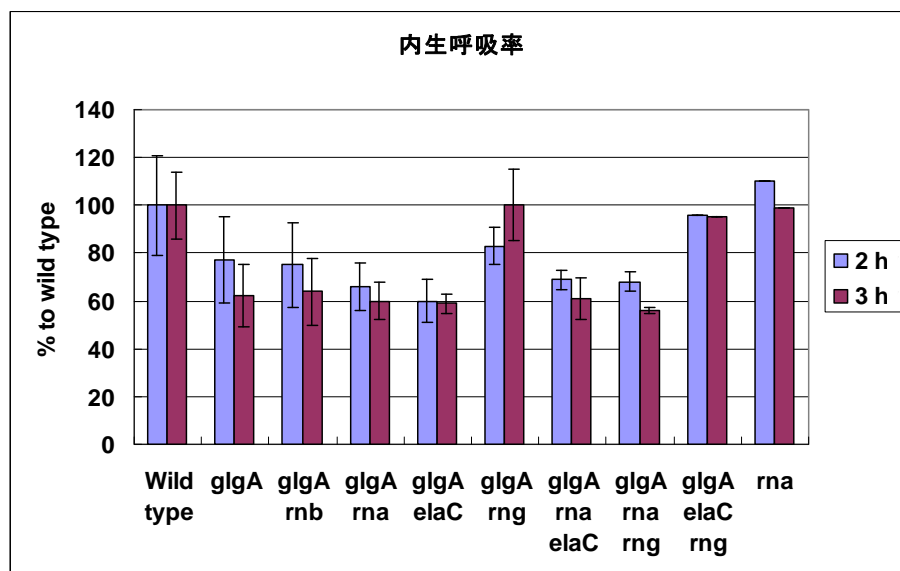


図 6 *glgA* と RNase 欠損の多重突然変異の内生呼吸

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。

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

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 h)	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。

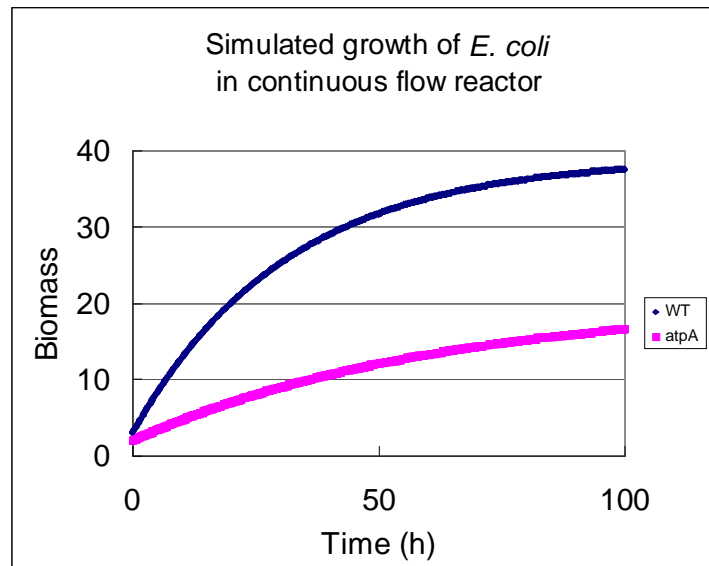


図7 野生型および *atpA* 突然変異体の曝気槽内での増殖のシミュレーション

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。

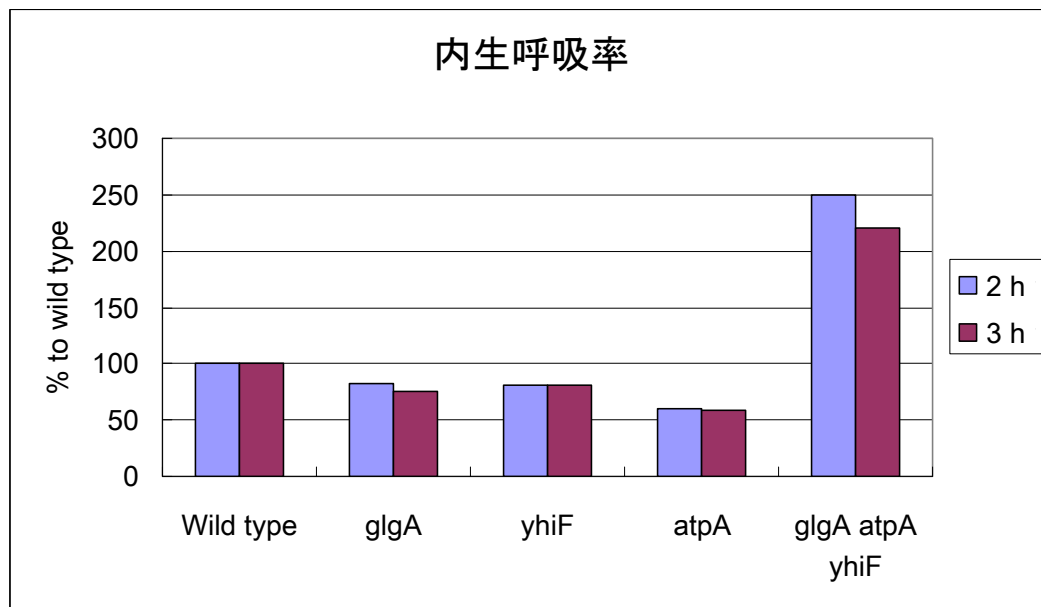


図 8 *atpA*, *yhiF* および *glgA* 変異の内生呼吸に対する影響

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しょうか? *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GC-QMS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、分析の際に大气が混入した可能性が高いことが示された。

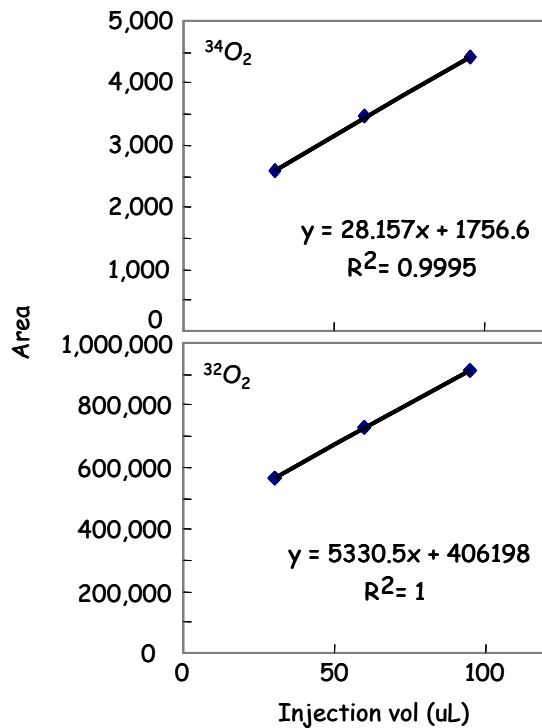


図9 大气 25-100 $\mu\ell$ をGC-QMSで分析したときの $^{32}\text{O}_2$ (下図)および $^{34}\text{O}_2$ (上図)のピークエリア積分値。

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气の吸い込みがないこと、および4)で述べた感度が得られるか、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。大气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、大气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。

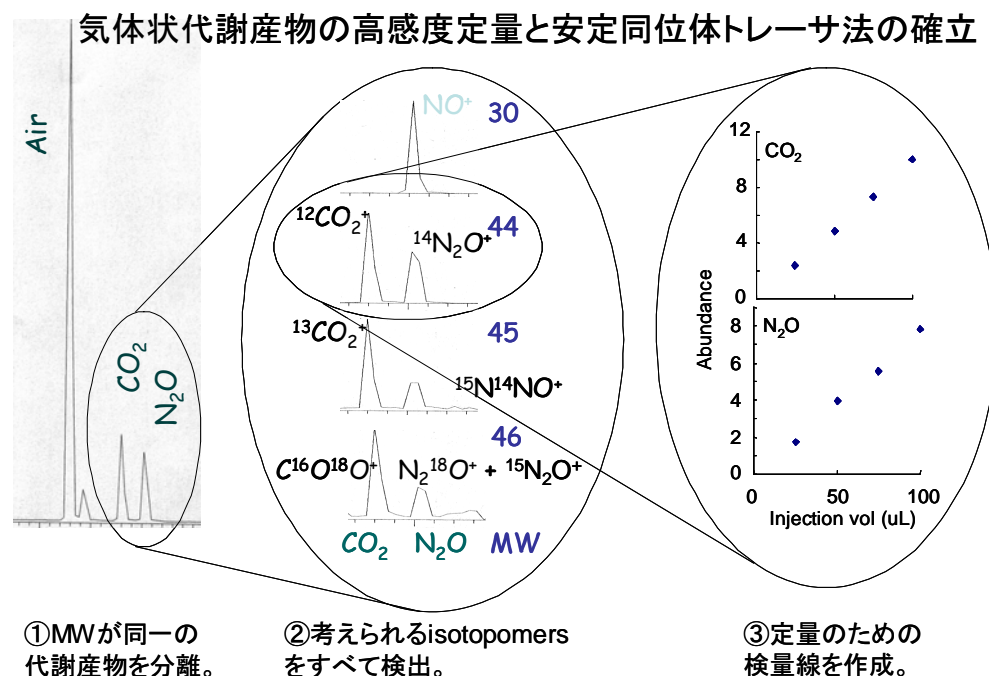


図 10 気体状代謝産物の GC-QMS による測定

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、大腸菌バイオマスが ^{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 GC-QMS 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。

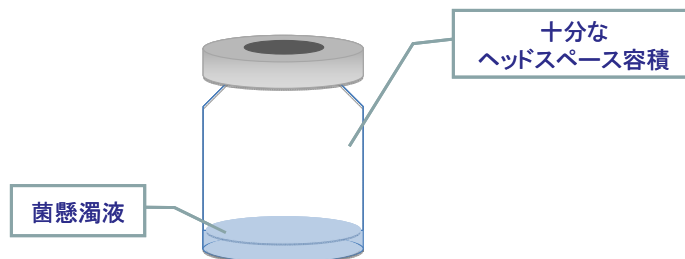


図 11 インキュベーション実験で使用したバイアルの模式図。

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が極めて重要である。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。

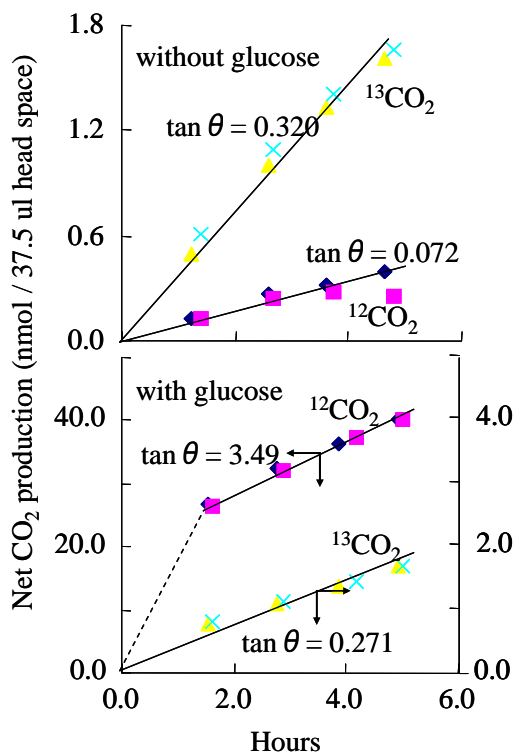


図 12 ^{13}C で標識した大腸菌 (野生株) 菌体の内生呼吸速度の測定 (上図) と、内生呼吸に対するグルコースの影響。内生呼吸は菌体の ^{13}C -標識貯蔵物質由来の $^{13}\text{CO}_2$ の生成速度として測定した。

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応えることになる。

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 GC-QMS 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、GC-QMS 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。GC-QMS 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

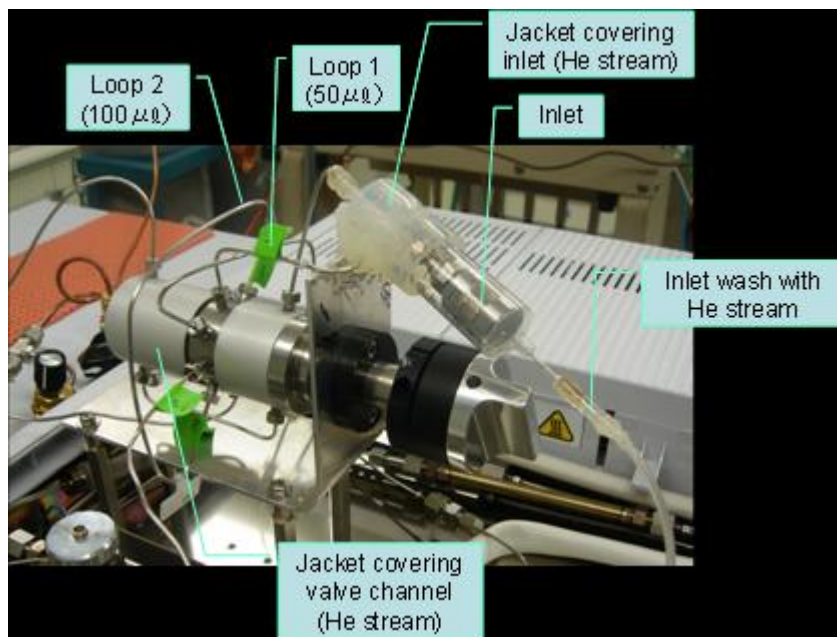


図 13 大気からの酸素の混入を防止するために試作し、GC-QMS に取り付けたインジェクション部の写真。ジャケット付きの 8 方バルブには 2 つの定量ループを付け、インジェクション・ポートもジャケットで覆った。両方のジャケットには超高純度 He を流し続け、大気との遮断を行った。

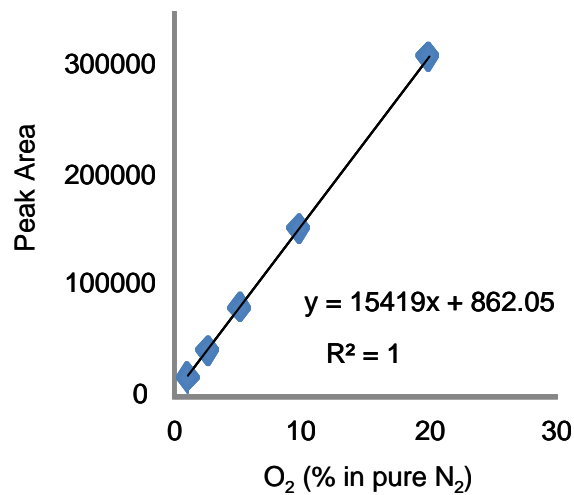


図 14 GC-QMS を用いて作成した O₂ ガスの検量線。

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 GC-QMS 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)。

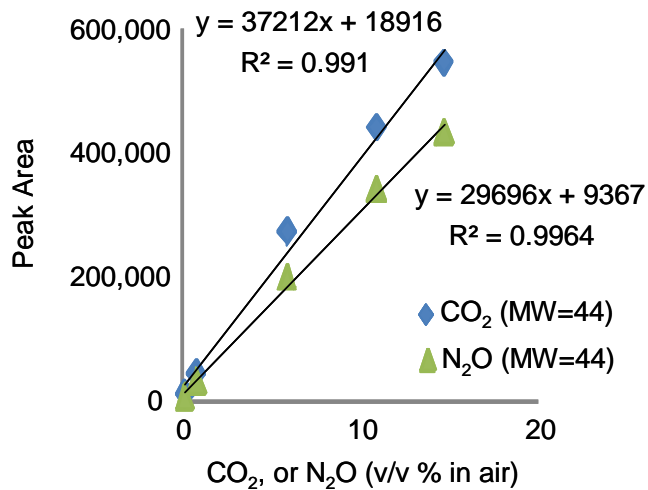


図 15 GC-QMS を用いて作成した CO₂ と N₂O の検量線

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 GC-QMS に導入して分析した。

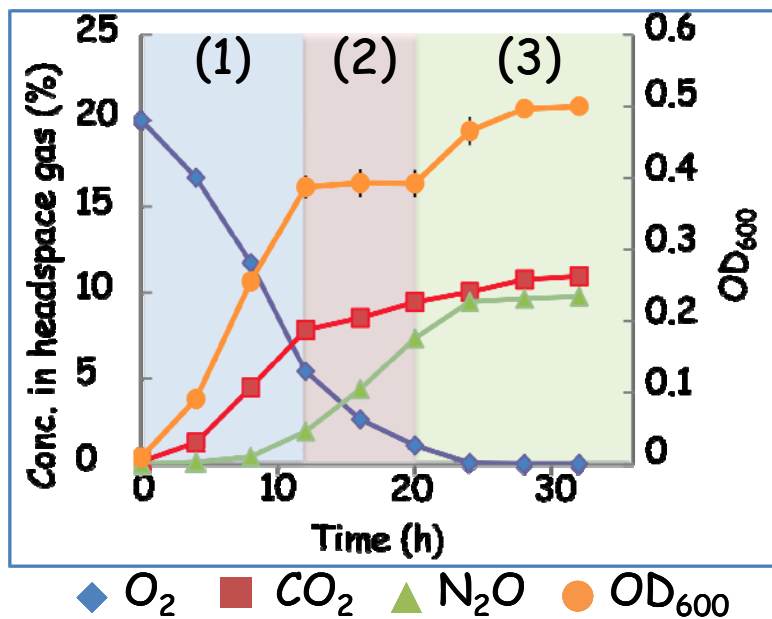


図 16 脱窒細菌 *Pseudomonas* 属の脱窒細菌を密閉したバイアルに入れて培養し、ヘッドスペース中の O₂, CO₂, および N₂O 濃度の経時変化をみたモデル実験の結果。

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 GC-QMS 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) 内生呼吸と外生呼吸の測定法

分離したそれぞれの株を LB 培地中、30℃で一晩 (14 時間) 培養した。4℃で 10,000 rpm、5 分間遠心し、沈降した細胞を、100 mM リン酸バッファー (pH 7.4) にけん濁した。再度、4℃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℃で振とうしながら、一定時間保った後、クラーク型酸素電極を用い、30℃で、細菌の呼吸速度を測定した。リン酸バッファーにけん濁された直後から 30 分間は、呼吸速度が急速に減少する場合が多かった。一方、けん濁後 2-3 時間での呼吸速度は、ほぼ一定であった。LB 培地よりリン酸バッファーに移した直後では、代謝され易い代謝中間体が菌体内に残って呼吸速度が高いが、それ

を消費した後は、貯蔵物質がほぼ一定の速度で徐々に消費されるのであろう。そこで、リン酸バッファーにけん濁後 2 時間および 3 時間での呼吸速度の平均を、内生呼吸速度と定義した。

また、このけん濁液に LB を 1/30 量加えると、呼吸速度は著しく促進された。この時の呼吸速度を、（内生呼吸＋外生呼吸）速度と定義した。

測定に用いたけん濁液を遠心し、集めた菌体を 110°C で 2 時間乾燥させ、乾重量を測定した。呼吸速度は、 O_2 consumed per min per mg dry weight で表わした。

3) 内生呼吸と外生呼吸

分離した細菌を培養し、そのけん濁液の酸素消費量をクラーク型酸素電極を用いて測定した。このけん濁液に外から基質を与えない時の酸素消費を内生呼吸、LB 培地あるいはグルコースなどの基質を与えた時の酸素消費量を外生呼吸とした。測定は独立に複数回行い、その平均値を算出した。標準誤差は細菌毎で異なるが、測定値の 30% 程度のものが中心であった。代表的な結果を表 6 に示した。

Source	Genus species	r ₁	r ₂	Ratio
Human	<i>Escherichia coli</i> (strain K-12)	394.5	9.8	40.3
HS	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (strain E3)	281.5	9.9	28.4
CH	<i>Enterobacter</i> sp. (strain B5)	413.0	15.7	26.4
PE	<i>Comamonas</i> sp. (strain D2)	205.5	7.9	26.2
PA	<i>Achromobacter</i> sp. (strain E7)	325.5	13.1	24.9
PA	<i>Arthrobacter</i> sp. (strain B4)	294.0	14.4	20.4
HS	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (strain E1)	293.0	15.2	19.3
PE	<i>Comamonas</i> sp. (strain D2)	323.5	20.7	15.7
CH	<i>Pantoea agglomerans</i> (strain A5)	176.0	11.9	14.8
PE	<i>Stenotrophomonas</i> (strain D3)	278.0	19.4	14.4
PE	<i>Acinetobacter</i> sp. (strain F6)	341.5	27.6	12.4
HS	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (strain E2)	382.0	37.9	10.1
PE	<i>Paracoccus</i> sp. (strain D4)	271.0	28.0	9.7
PE	<i>Pseudomonas syringae</i> (strain D1)	304.5	45.6	6.7
PA	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (strain B2)	213.0	33.5	6.4
PA	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (strain B1)	186.0	32.9	5.7
CH	<i>Sphingopyxis</i> sp. (strain F2)	135.0	37.6	3.6
CH	<i>Bacillus cereus</i> (strain A3)	251.0	76.9	3.3
CH	<i>Bacillus</i> sp. (strain A4)	131.0	53.0	2.5
CH	<i>Bacillus cereus</i> (strain A2)	119.5	49.4	2.4
PE	<i>Bacillus subtilis</i> (strain A1)	27.5	11.8	2.3

表6 活性汚泥等から分離した細菌の内生呼吸と外生呼吸

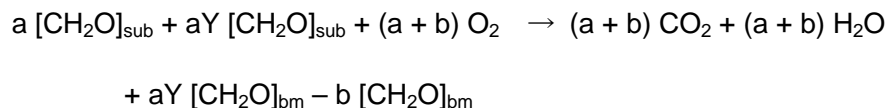
活性汚泥等から分離した細菌を LB 培地 30°Cで振とう培養した後、100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) にけん濁。その後、30°Cで 2-3 時間振とう培養し、菌体の呼吸速度を酸素電極を

用いて測定。この呼吸速度を内生呼吸速度 (r_2) とした。同様に培養した菌液に LB を 1/30 量添加した時の呼吸速度を、(内生呼吸+外生呼吸) とし、外生呼吸速度 (r_1) を計算。呼吸速度の単位は、 $\mu\text{g oxygen consumed per h per mg dry weight}$ 。

BOD 分解における酸素消費効率を示すパラメーターとして、外生呼吸速度と内生呼吸速度の比 (R) を用いることができる。この比は、活性汚泥構成菌の種類によってまちまちであった。この比が高い、すなわち、酸素消費効率の高い菌としては、*Enterobacteriaceae* に属する *Enterobacter* sp. B5 株や *Escherichia coli* をあげることができる ($R > 25$)。一方、*Bacillus* 属の菌は、酸素消費効率が低かった ($R < 3$)。活性汚泥中に酸素消費効率が高い菌を優占化させることができれば、曝気効率は上昇するものと考えられる。

4) 菌体収率と世代時間との関係 (酸素十分条件下)

ここで、BOD 分解における細菌の増殖について考える。BOD 分解と増殖とは、以下の式で記述できる。ここで Y は菌体収率である。



$[\text{CH}_2\text{O}]_{\text{sub}}$: 基質

$[\text{CH}_2\text{O}]_{\text{bm}}$: Biomass

a : 外生呼吸量 = $r_1 \times X(t) \times t$ [$X(t)$: 菌体量 ; t : 時間]

b : 内生呼吸量 = $r_2 \times X(t) \times t$

Y : 菌体収率 (mol cell mass/mol of oxygen)

この関係式から、(a + b) モルの酸素を消費して、a(1 + Y)モルの基質 (BOD) が分解されることが解る。すなわち、BOD 分解のための酸素消費効率を考えるならば、上式から、

$$E (\text{酸素消費効率}) = a(1 + Y)/(a + b)$$

と表現されるべきであろう。しかし、菌体収率を実験的に求めることは容易ではない。

一方、対数増殖期にある細菌では、以下の関係が成立する。

時刻 t での菌濃度を $X(t)$ とする。 dt の間での $X(t)$ の増加 $dX(t)$ は：

$$dX(t) = X(t) [r_1 Y - r_2] dt$$

$$X(t) = X_0 \times \exp(k \times t) \quad (1)$$

但し、 $k = r_1 Y - r_2$ である。一方、対数増殖の式は、

$$X(t) = X_0 \times 2^{(t/T)} \quad (2)$$

但し、 T は世代時間である。(1)式と(2)式を比較して、

$$r_1 Y - r_2 = \ln 2 / T$$

すなわち、 r_1 、 r_2 、 T を測定すれば、 Y は推定できる。

そこで、対数増殖期にある細菌の世代時間 T を求め、増殖収率 Y を計算し、酸素消費効率を計算することとした。

5) 曝気槽内での酸素の利用効率

曝気槽内で、基質を完全分解するのに必要な菌体量を X_{\min} 、時刻 t の菌体量を $X(t)$ とする。

その場合、基質が完全分解された時点での酸素利用効率 E は：

$$E = X_{\min} \times [(1 + Y) \times r_1] / [(X_{\min} \times r_1) + (X(t) \times r_2)]$$

$X(t)$ と X_{\min} との比、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曝気槽内に存在するかを f で表せば：

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

$$E = [(1 + Y) \times r_1] / [r_1 + f \times r_2]$$

この式は、基質が完全分解される前に酸素が消費されてしまった場合にでも成立するが、基質が分解された後については内生呼吸による酸素消費のみが起こるわけであるから、酸素利用効率は、 E の値よりもどんどん下がっていく。

ちなみに、基質が完全分解される以前においては、BOD 酸化反応による酸素消費と、内生呼吸による酸素消費との比は：

$$r_1 : f \times r_2$$

である。

以上の関係を用い、酸素利用効率と f との関係を求めた。その一部を図 17 に示してある。この際、増殖効率 Y については、各分離株の世代時間より求めて計算を行っている。

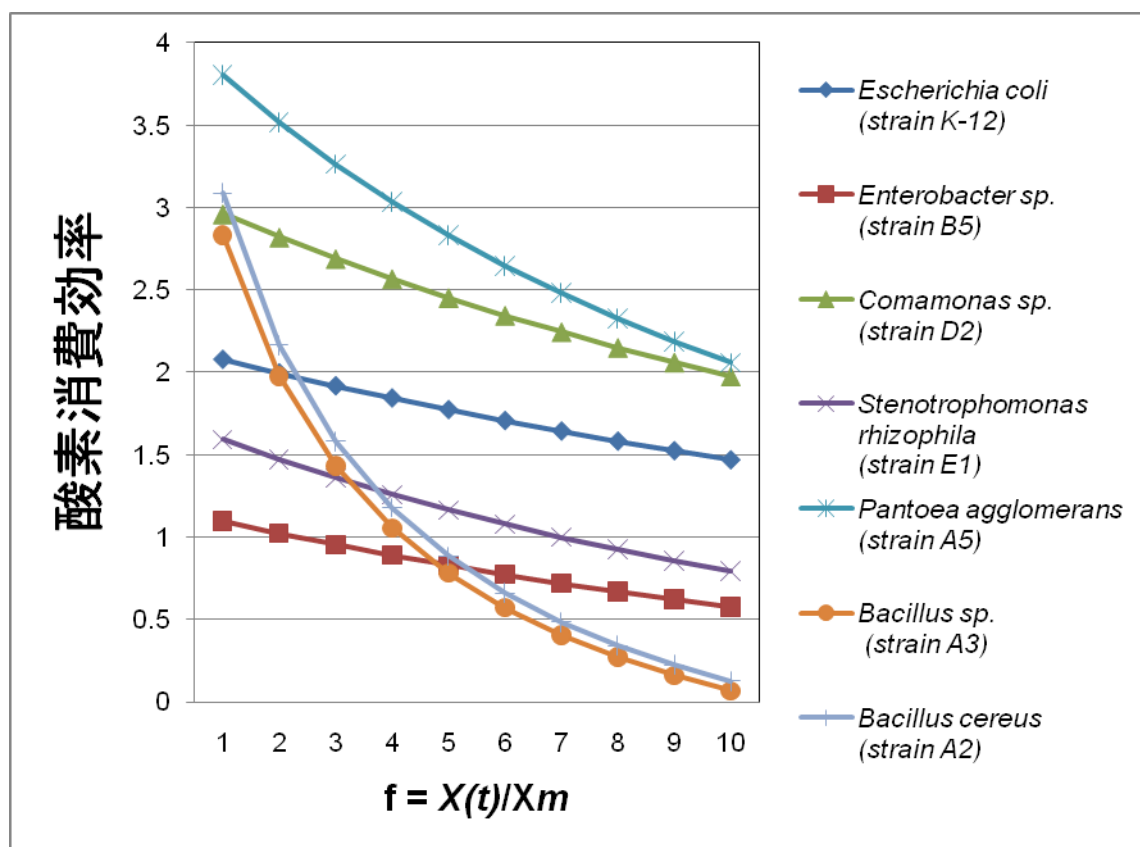


図 17 酸素利用効率と f との関係

基質の処理に必要な最小限の MLSS、 $X(t) = X_{\min}$ を用いた場合、すなわち $f=1$ の条件下で、当然のことながら、酸素利用効率が最大である。しかし、実際の活性汚泥の運転においては、それよりもはるかに高い MLSS での運転が行われているから、酸素利用効率は f に従って減少する。ここで、内生呼吸率の高い *Bacillus* 属においては、 f に依存する減少量が、内生呼吸率の低い細菌に比べて著しいことがわかる。

6) 酸素不十分条件下での BOD 分解

以上の結果と考察から、内生呼吸と外生呼吸の比、(内生呼吸) / (外生呼吸)、が高い値を持つ細菌による BOD 処理は、酸素不十分条件下では効率が悪いこと、すなわち、供給された酸素のほとんどが内生呼吸で消費されてしまう結果、BOD 分解が阻害されるであろうことが予想された。そこで、これを実験的に示すことにした。BOD を実験的に定量することは手間がかかり、また、誤差も大きいことから、ここでは、 ^{13}C -グルコースを外生の基質として加え、 $^{13}\text{CO}_2$ の発生量を“酸素消費に伴った BOD 分解量”として捉え、また、その時発生した $^{12}\text{CO}_2$ の発生量を内生呼吸量とした。 $^{12}\text{CO}_2$ および $^{13}\text{CO}_2$ の測定については GC-QMS 法を用いた。

内生呼吸の低い株 (*Enterobacter* sp. B5 株) と、と内生呼吸の高い株 (*Bacillus* sp. A3 株) を選び、酸素不十分条件下 (利用できる酸素濃度が、0.23、1.2 および 2.0 mM) での、外生呼吸によるグルコース分解量を測定した。もちいた細菌の濃度は、 f の値で 10 に相当するようにした。*Enterobacter* sp. B5 株においては、上記いずれの酸素濃度でも酸素利用効率はほぼ一定で、約 0.6 であった (注: この実験では、菌の増殖に伴うグルコースの菌体への取り込みを考慮していない: すなわち、前述の式で $Y = 0$ と仮定した時の酸素利用効率を測定していることになる)。一方、*Bacillus* sp. A3 株における酸素利用効率は、酸素濃度が低い条件から順に、0.02、0.11、0.16 となった。

この結果から、(1) 基質 (BOD) の好氣的分解は酸素が十分に供給されない条件では内生呼吸によって制限されること、(2) その結果、内生呼吸が高い細菌では、低い細菌に比べて、BOD

の分解が低下することが示された。内生呼吸が高い細菌の方が低い細菌よりも BOD 分解において不利であろうとの感触は、多くの研究者が持っているところであるが、それを実験的に証明したのは、我々が知る限り、本研究が世界初となる。

7) 分離した細菌の資化性

以上の結果から、酸素利用効率の高い菌を固定化し BOD 処理を行えば、内生呼吸による酸素消費を減少させ、ひいては、処理場における電力消費量を減少できると思われる。しかし、汚水処理施設には様々な有機物が流入してくるため、単独、あるいは少数の細菌の組合せで BOD 処理をするためには、それらの細菌は、広い有機化合物に対して資化性を示すものでなければならない。

そこで、本研究で分離した細菌の資化性を、API 50CH を用いてテストした。結果の一部を表 3 に示した。一つの化合物に対して資化性を示した場合、スコアを+1、弱い資化性を示した場合はスコアを+0.5 とし、それぞれの分離株について、その合計スコアを比較した。

Substrate	<i>Bacillus subtilis</i> A1	<i>Bacillus cerius</i> A2	<i>Brevundimonas</i> sp. B1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> E1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> E2
Control	0	0	0	0	0
Glycerol	1	0.5	0	1	0
L-arabinose	1	0	0	1	0
Ribose	1	1	0	0	0
D-xylose	0.5	0	0	0.5	0
Galactose	0	0	0	0.5	0
D-glucose	1	1	0	1	0.5
D-fructose	1	0.5	0	1	0.5
D-mannose	1	0	0	1	0.5
Rhamnose	0	0	0.5	0	0
Inositol	1	0	0	0	0
Manitol	1	0	0	0.5	0
Sorbitol	1	0	0	0	0
a-methyl-D-mannoside	0	0	0	0	0
a-methyl-D-glucoside	0	0	0	0.5	0
N-acetyl glucosamine	0	1	0	0	0
Amygdalin	0	0	0	1	0.5
Esculin	1	1	1	1	1
Salicin	0	0	0	1	0
Celobiose	0	0	0	1	0
Maltose	1	1	0.5	1	1
Lactose	0	0	0	1	0.5
Melibiose	0	0	0	1	0
Sucrose	1	1	0	1	0
Trehalose	1	1	0	1	0
Inulin	1	0	0	0	0
Melezitose	0	0	0	0.5	0
D-raffinose	0	0	0	0.5	0
Starch	0	0	0	1	0
Glycogen	0	0.5	0	1	0
Xylitol	0	0	0	0	0
b-gentiobiose	0	0	0	1	0.5
D-turanose	0	0	0	0.5	0
Score	14.5	8.5	2	20.5	5

表 7 API を用いた資化性検定：0：資化せず、0.5：弱い資化、1：資化

このテストで、高い資化性を持っていると思われた分離株を表 8 に示している。*Enterobacter* sp. B5 は資化性にも優れていることが示された。

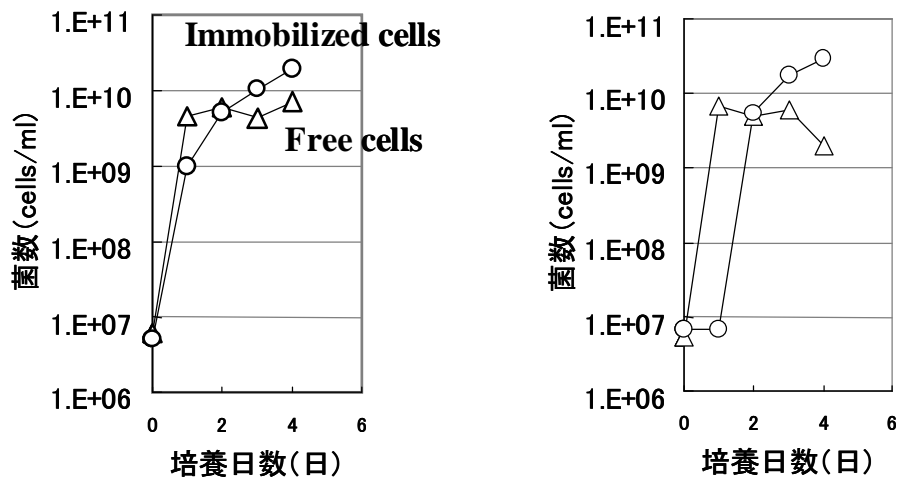
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E10	38.5
<i>Enterobacter</i> sp. strain B5	37
<i>Pantoea agglomerans</i> strain A5	33.5
<i>Bacillus subtilis</i> strain A10	25.5
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E1	23.5
<i>Escherichia coli</i> K-12	23
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain 2	21
<i>Arthrobacter protophormiae</i> strain B4	20

表 8 資化性ベスト 8

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。



a) *Pseudomonas* sp.

b) *Serratia* sp.

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ネーション防止技術

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ネーション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酸・アルカリ処理（pHショック）によるコンタミネーション抑制効果を、硝化反応をモデルに検討した。トレーサ菌としてアンモニア酸化細菌（AOB：Ammonia-oxidizing bacteria）と亜硝酸酸化細菌（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。連続硝化実験装置を図 19 に示す。容積 10L の硝化槽へ包括固定化担体を 10%添加しアンモニア（ NH_4 ）を注入し曝気処理した。

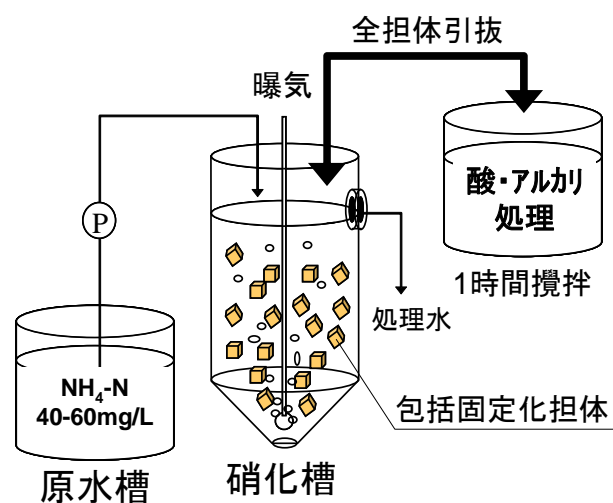


図 19 連続硝化実験装置

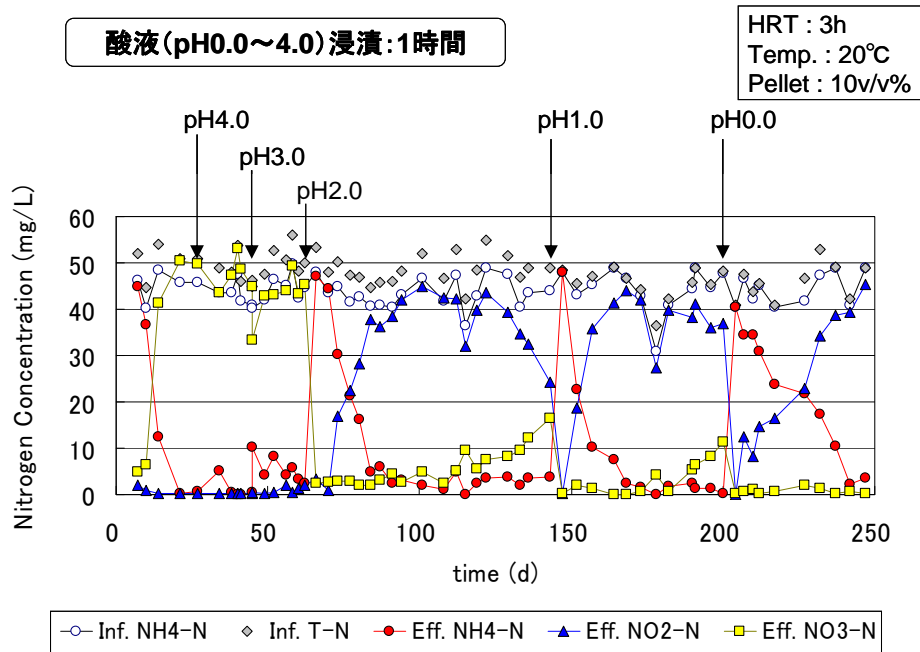


図 20 酸処理担体による無機合成廃水の連続処理

全担体を取り出し各 pH の酸液へ浸漬、中和後返槽

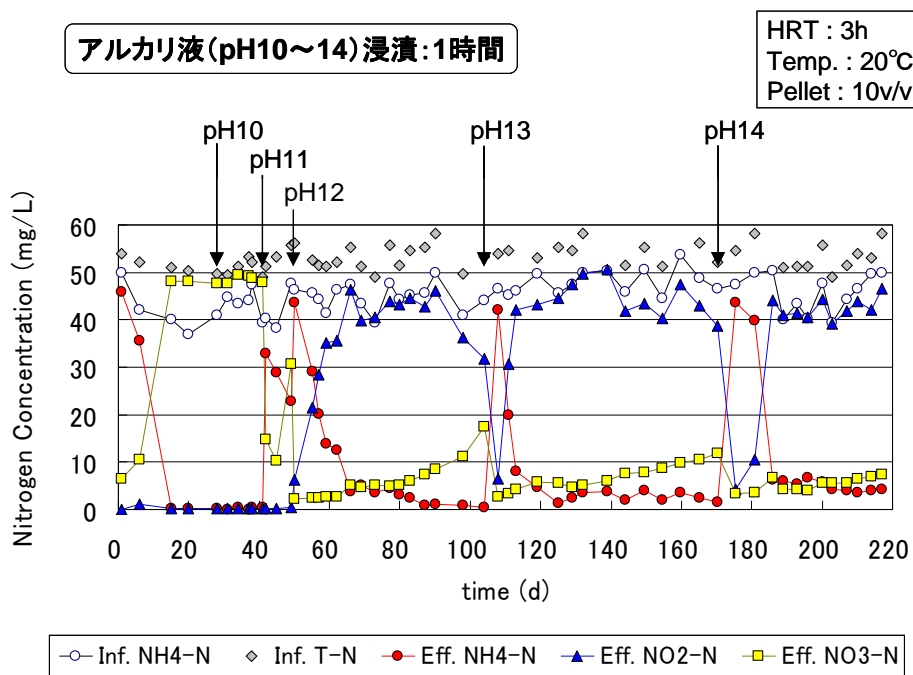


図 21 アルカリ処理担体による無機合成廃水の連続処理

全担体を取り出し各 pH のアルカリ液へ浸漬、中和後返槽

連続硝化実験結果を図 20 および図 21 に示す。その結果、酸溶液 (pH2.0 以下) もしくはアルカリ溶液 (pH12<) に 1 時間担体を浸漬処理することにより、固定化担体の有用な AOB は生かしつつ、不要な NOB の増殖を抑制させることが十分可能であることを見出した。

3) 内生呼吸低減菌の安定維持方法の検討

実排水処理施設から採取した加熱処理担体 (90℃温水, 1 時間浸漬処理) およびアルカリ処理担体 (pH13 アルカリ溶液, 1 時間浸漬処理) を作製し、それぞれの担体から内生呼吸低減菌を複数種単離した (表 8)。それらの中から加熱処理担体由来の

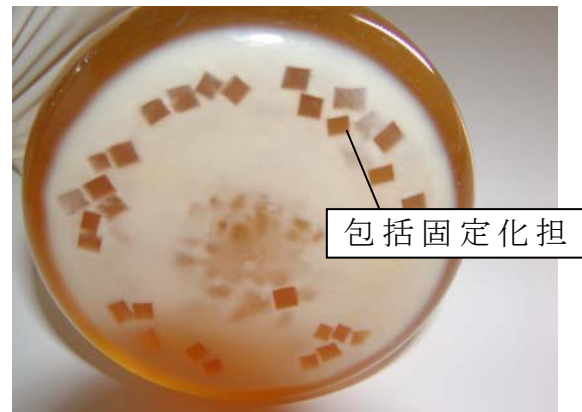


図 22 再増殖した *Arthrobacter sp.* B4 株

Stenotrophomonas rhizophila E1 株, アルカリ処理担体由来の *Arthrobacter sp.* B4 株, *Achromobacter sp.* E7 株を増殖後回収し包括固定化した担体 (3mm 立法角) を作製し, pH ショック (pH13, 1 時間) 後の再増殖能を評価した。その結果, pH ショック後の各担体を中和し滅菌済みナイフで分割後, 滅菌済み LB 培地内で培養したところ, いずれの担体においても図 22 に示すような細菌の再増殖が確認され, これまで検討してきたアンモニア酸化細菌意外においても, 目的とする微生物活性は維持しつつ, 目的外の微生物を選択的に排除することが十分可能であることを確認した。

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用いることで、内生呼吸低減菌の安定保持が可能になることを見出した。なお、排水中の有機物は硝酸呼吸にも消費されるため、内生呼吸低減菌による曝気量低減効果は、BOD/N 比が 3 以上の廃水において有効な手法だと考えられる。

2. 1. 5 亜硝酸型硝化技術の評価

代表的な窒素処理法である硝化・脱窒反応では、まず好気槽内で廃水中のアンモニアを AOB の働きによって亜硝酸 (NO_2) へ酸化し、更に NOB の働きによって NO_2 から硝酸 (NO_3) へ酸化させる (硝化反応)。次に嫌気槽内において、 NO_3 から NO_2 へ還元し、続いて NO_2 から N_2O 、さらに N_2 ガスへ還元させる (脱窒反応)。つまり、従来の硝化・脱窒反応は NO_2 から NO_3 への酸化反応と NO_3 から NO_2 への還元反応において無駄な往復反応をしていると言え、その原因となる NOB 活性を抑制することができれば、硝化槽で酸素消費量を理論値で最大 25% 削減できる。また、脱窒反応に必要なメタノール供給量も理論値で最大 40% 削減できる。NOB 活性を抑制した亜硝酸型硝化技術の開発の歴史は古く、これまでに好気槽内の溶存酸素濃度を低下させる方法や、好気槽内の遊離アンモニア濃度を上昇させる方法、好気槽内塩濃度を高く維持する方法等が提案されてきた。しかしながら、これらの方法は処理環境の変化により、NOB 活性の抑制が極めて不安定となる課題があった。

そこで本研究開発では、「2. 1. 4 有用菌の安定維持方法」で検討した pH ショック法により NOB 活性を抑制する亜硝酸型硝化技術を評価した。

1) 亜硝酸型硝化の酸素およびメタノール消費量の削減効果

硝化反応に必要な酸素と脱窒反応に必要なメタノールの供給量低減を目的として、硝化細菌の包括固定化担体をアルカリ溶液へ一時的に浸漬処理することによって、アンモニア酸化活性を維持しつつ亜硝酸酸化活性のみを抑制する pH ショック法の酸素消費とメタノール消費量の低減効果を評価した。

亜硝酸型硝化プロセスと脱窒プロセス組み合わせた循環変法による硝化・脱窒処理装置を用いた。処理装置を図 23 に、仕様を表 9 に示す。塩ビ製の硝化槽と脱窒槽を連結し、脱窒槽に攪拌機、硝化槽に散気装置を設置した。硝化槽に担体 10%、脱窒槽に担体 20% を充填し、硝化槽の溶存酸素濃度 (DO : Dissolved Oxygen) 5 mg/L 以上、水温 20°C、硝化槽 HRT3.0 時間の条件で無

機合成窒素廃水を連続通水した。脱窒処理に必要なメタノールは原水 T-N の 2～3 倍程度となるように脱窒槽へ添加した。連続処理実験の原水として、表 10 に示す無機合成窒素廃水 ($\text{NH}_4\text{-N}$ 40mg/L) を使用した。使用した担体は、ポリエチレングリコール系のプレポリマーにより活性汚泥を包括固定化したものであり、当社の担体造粒工場にて製造、成型した担体を用いた。担体中の汚泥含有量は重量比で 2% であり、担体の形状は 3mm 角の立方体のものである。

まず、実験開始時は硝化槽のみで立ち上げ運転し、その後、前段に脱窒槽を配置し循環変法（循環比 2:循環量/原水量）の運転に切り替え、脱窒処理が安定した後、全硝化担体を引抜き pH ショック処理 (pH13, 1 時間) した。

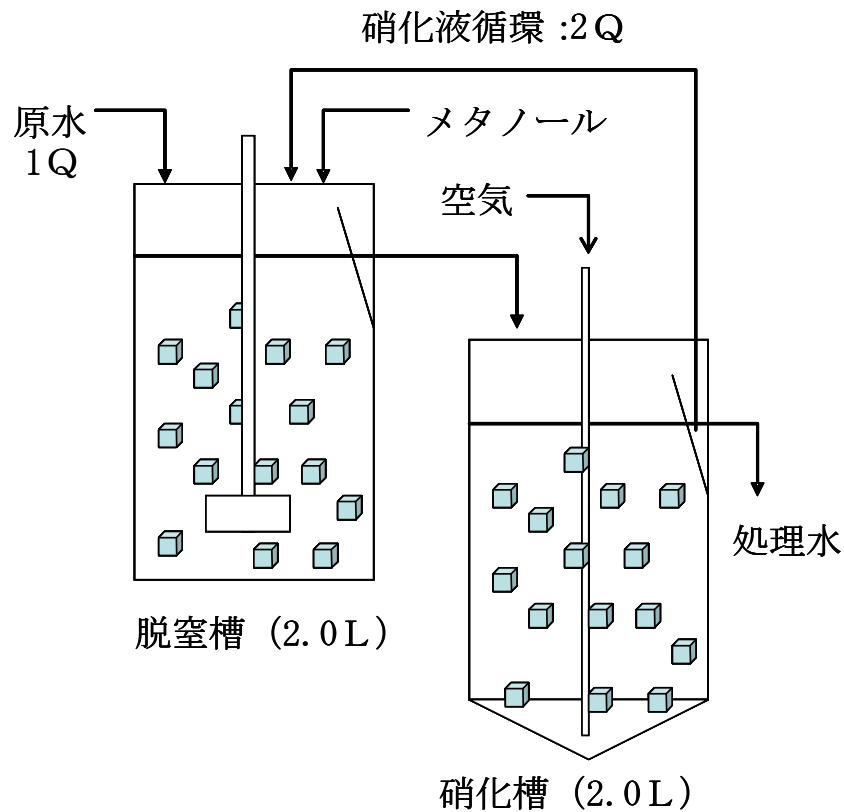


図 23 硝化・脱窒処理装置（循環変法）

項目	硝化槽	脱窒槽
材質	透明塩化ビニル製	
容積	2.0L	
寸法	φ 150mm×H300mm	
配管	透明塩化ビニルチューブ	
充填担体	ポリエチレングリコール系プレポリマー製	
担体充填率	10%	20%
付属機器	ブロアー (40L/min)	攪拌機 (~600rpm)

表 9 硝化・脱窒処理装置仕様

項目	濃度 (mg/L)
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	94.0
NaHCO_3	468
NaCl	20.4
KCl	9.60
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	46.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	33.6
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9.60

表 10 無機合成窒素廃水の組成

硝化・脱窒処理実験の結果を図 24 に示す。まず通常の硝酸型硝化処理を立上げ、その後循環変法による硝化・脱窒処理へ移行した。脱窒活性が安定した運転 35 日目に全担体を対象に pH ショック処理 (pH13, 1 時間) を行った結果、その後 77 日間に渡り処理水に $\text{NO}_3\text{-N}$ がほとんど残存せず、 $\text{NO}_2\text{-N}$ のみが 4~12mg/L 残留する亜硝酸型硝化の状態を維持できた。

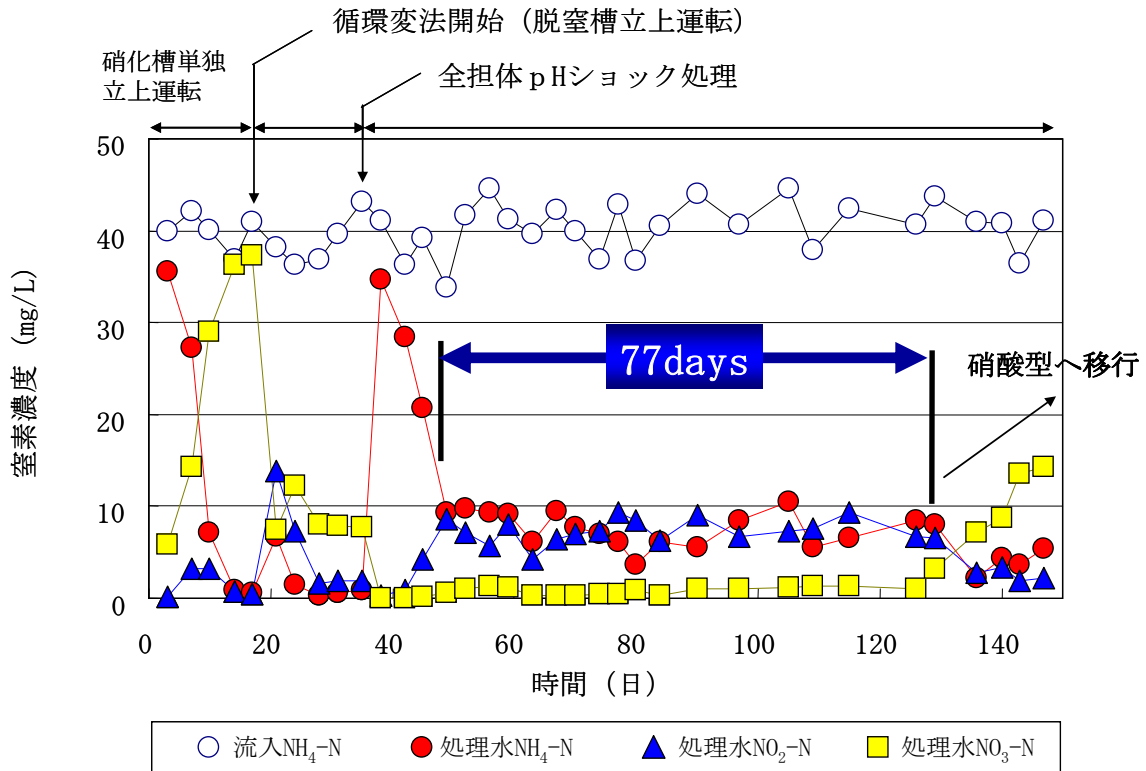


図 24 連続硝化・脱窒処理結果 (循環変法)

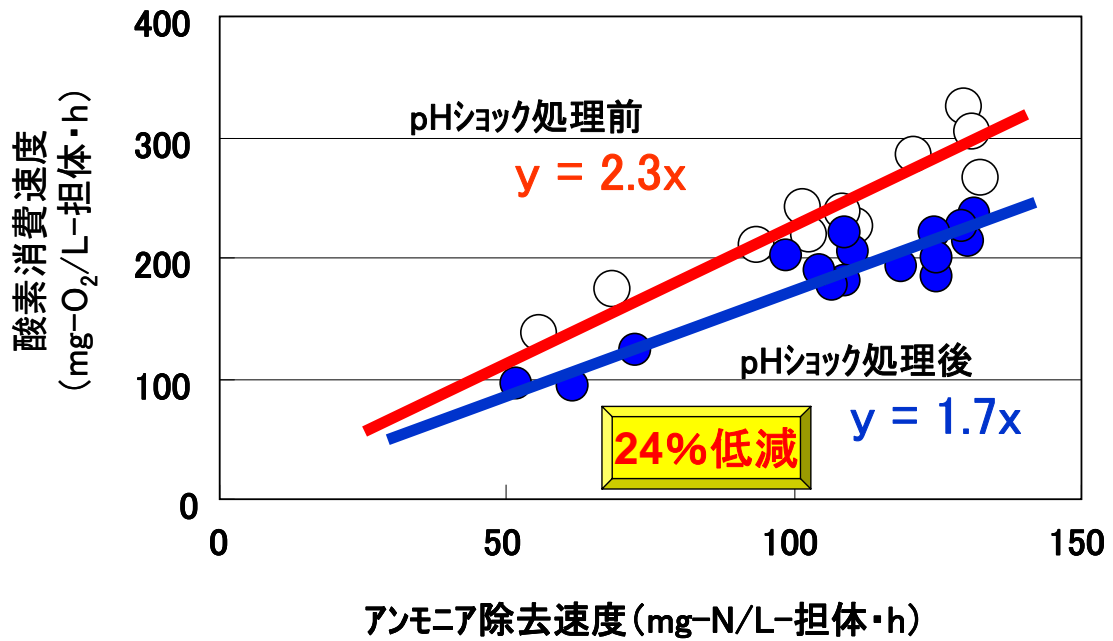


図 25 各担体の酸素消費速度およびアンモニア除去速度の比較

pH ショック処理前後の担体を一定量取出し、それぞれの酸素消費速度およびアンモニア除去速度を求め比較解析した結果を図 25 に示す。その結果、pH ショック後の亜硝酸型硝化担体は通常の硝化担体に比べ酸素消費量が平均で 24%削減され、理論値と同等となることを確認した。

理論上、亜硝酸からの脱窒は硝酸からの脱窒にくらべ、水素体供給量が 40%削減できることが知られている。これまでの高濃度アンモニア処理実験における実測値においても脱窒反応におけるメタノール/N 比は、硝酸からの脱窒で 2.3~3.0, 亜硝酸からの脱窒で 1.4~2.0 となり、亜硝酸からの脱窒はメタノール供給量を 33~39%削減できることを確認している。

本実験における脱窒反応のメタノール/T-N 比を、メタノール消費量と脱窒した窒素量から求めた結果を図 26 に示す。その結果、硝酸型硝化処理状態（運転 28, 31, 35 日目）のメタノール/T-N 比の平均値は 2.8 であったのに対し、亜硝酸型硝化処理状態（52~129 日目）の平均値は 1.9 となった。このことから、本実験においても過去の検討と同様に、34%とほぼ理論値通りのメタノール削減効果が得られることを確認した。

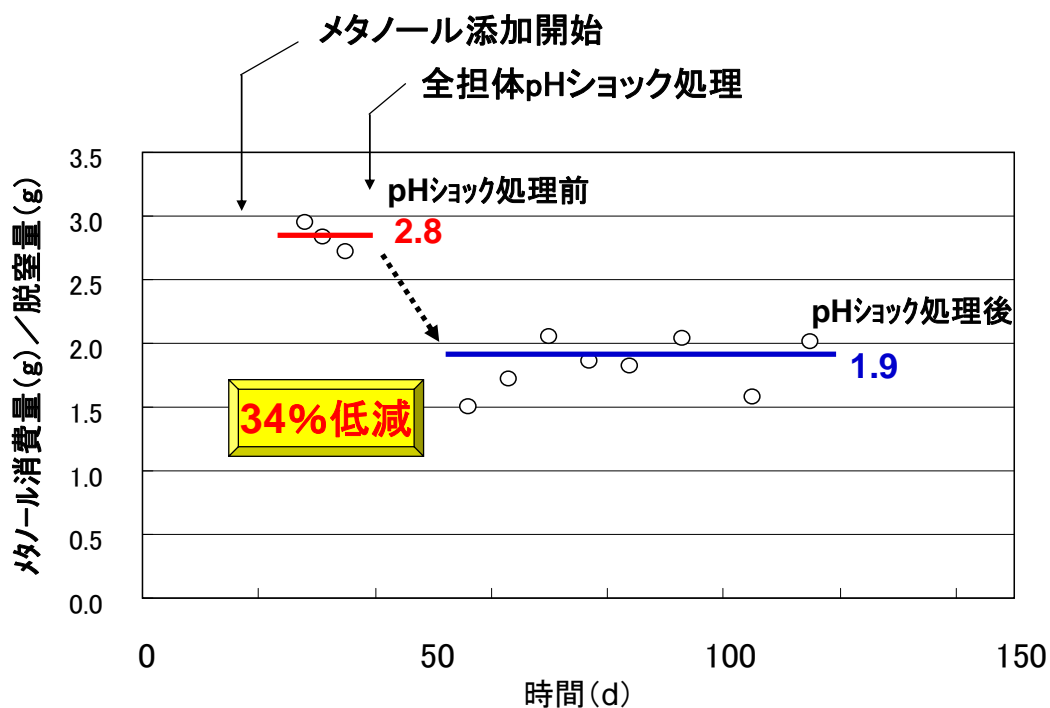


図 26 脱窒反応のメタノール/T-N 比

2) 亜硝酸型硝化に及ぼす遊離アンモニアの影響

亜硝酸酸化活性を抑制し多くの酸素供給量を削減する亜硝酸型硝化プロセスを維持する方法として、①槽内の遊離アンモニア濃度を高濃度に維持し、②酸素供給量を抑制し、③水温を高く維持する等が一般的に知られている。中でも遊離アンモニア濃度は pH、水温、そして総アンモニア濃度によって決定するため、亜硝酸酸化活性の抑制は対象廃水の水質によって決まる傾向にある。本研究では担体の pH ショック処理による NOB の活性抑制を試みているが、本法においても外部から流入する NOB の活性抑制には槽内遊離アンモニア濃度の維持が不可欠となる。

そこで、NOB 活性抑制のために必要な遊離アンモニア濃度を定量的に評価することを目的に、供給アンモニア濃度を変動した連続処理実験を行い、硝酸性性能の評価を行った。本実験に用いた連続処理装置を図 27 に示す。

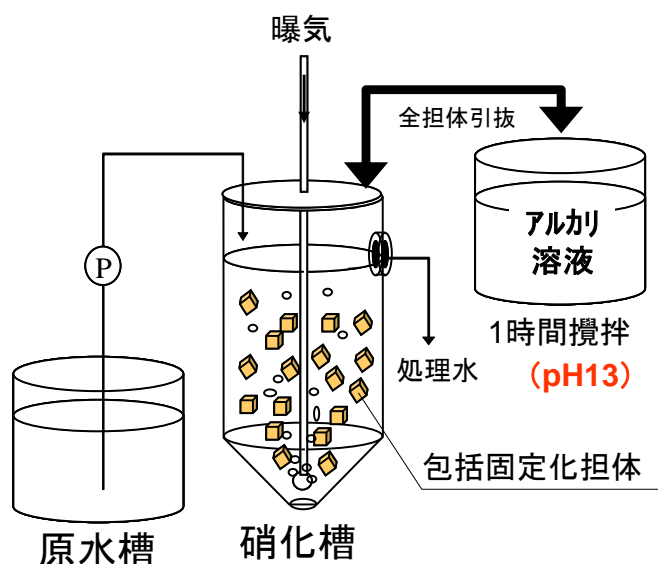


図 27 連続処理装置

硝化槽（容積 2L）を用いて $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 200mg/L の無機合成廃水を対象に連続処理を立ち上げた（Phase1）。その後、表 11 に示す工程で無機合成廃水の NH_4^+ 濃度を変更、または pH ショック処理を行い NO_2 、 NO_3 生成速度へ及ぼす遊離アンモニア濃度の影響を評価した。

その他の運転条件は、HRT7.5 h、平均水温 18°C、平均 pH8.1、平均 DO は 6.0 mg/L とした。遊離アンモニア濃度は Anthonissen¹⁾ らの計算式から算出した。

Phase	運転時間 (日)	平均流入 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/L)	備考
1	0-12	200	立上げ期間
2	13-33	192	—
3	34-44	244	—
4	45-61	97.2	—
5	62-69	201	—
6	70-77	238	—
7	78-100	199	100日目にpHショック処理
8	101-130	197	再立上げ期間
9	131-270	194	pHショック処理後

表 11 連続硝化処理条件

pH ショック処理は、硝化槽から供試担体を一度取り出し、pH13 に調整したアルカリ液へ投入して行った。担体は 20℃、80rpm の条件で 1 時間スターラ攪拌し、その後 pH 7.5 へ中和してから実験を行った。

連続処理実験の結果を図 28 に示す。硝化活性は約 2 週間で立ち上がりアンモニア除去速度は 0.34kg-N/ (m³・日) に達した (硝化率 55%)。その後、無機合成廃水の NH₄⁺濃度を増減させ連続処理を行った。その結果、処理水中には NO₂ が蓄積するのと同時に、NO₃ 生成活性が一定量維持された。運転 100 日目には全担体を pH ショック処理すると、NO₃ 生成が完全に抑制された亜硝酸型硝化状態へと移行した。

槽内遊離アンモニア濃度と NO₃ 生成速度を比較した結果を図 29 に示す。その結果、Phase1 から 2 へ移行すると、NO₃ 生成速度は平均で 0.13 kg-N/ (m³・日) まで上昇した。その後、Phase3 へ移行すると平均 NO₃ 生成速度は 0.054 kg-N/ (m³・日) まで低下した。これは遊離アンモニア

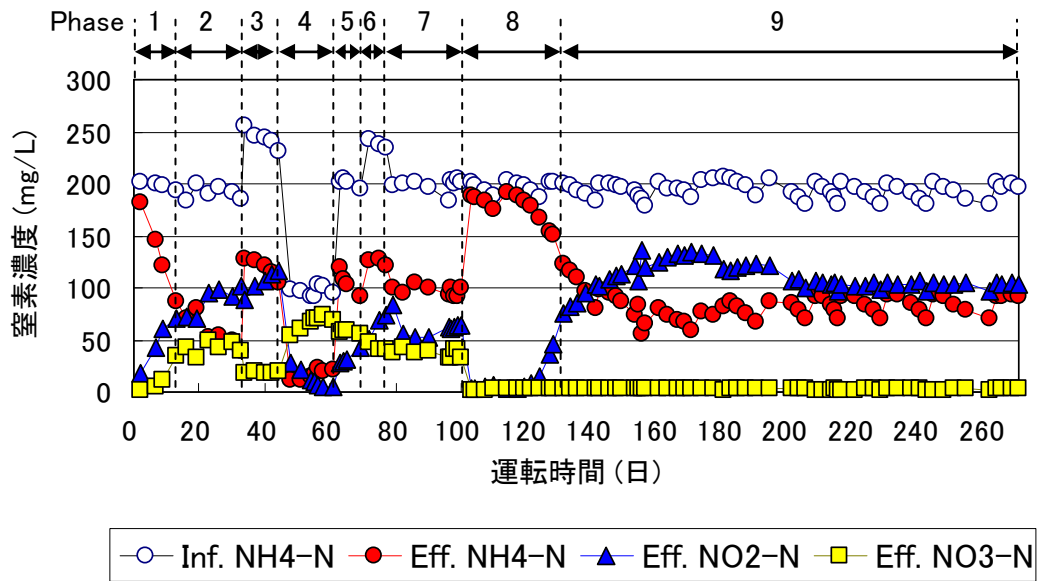


図 28 連続処理実験

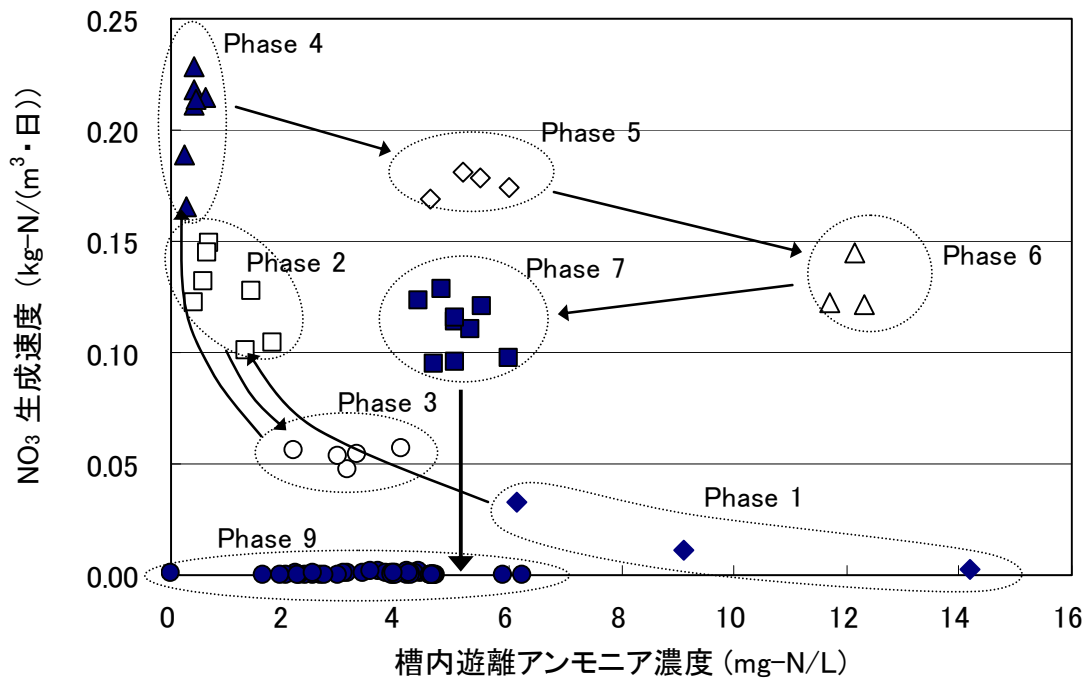


図 29 槽内遊離アンモニア濃度と NO₃ 生成速度の比較

が NOB 活性を抑制したためだと考えられた。しかしながら、その後 Phase4 を経てから Phase5, 6, 7 へ移行すると Phase3 よりも高い槽内遊離アンモニア濃度であるにもかかわらず、高い NO₃ 生成速度を示した。NO₃ 生成速度の履歴から、Phase3 と 4 において NOB 菌体密度が上昇していることが強く示唆されているため、NOB 菌体密度が一度上昇すると遊離アンモニア濃度による NO₃ 生成活性の抑制がスムーズに行われない現象が現れることが考えられた。一方、pH ショック処理後は槽内遊離アンモニア濃度にもかかわらず NO₃ 生成活性は完全に抑制されることを確認した。

3) 亜硝酸型硝化担体内細菌叢に及ぼす pH ショックの影響

「2) 亜硝酸型硝化に及ぼす遊離アンモニアの影響」において行った pH ショック処理 (pH13, 処理時間 1 時間) による担体内の細菌量の変化を評価するため、処理前後の担体内の DNA 量を測定した。結果を図 30 に示す。活性と細菌量の関係を確認するため DNA 測定時の硝化活性についても併記した。その結果、pH ショック処理直後は DNA 量が 46% まで減少し、硝化活性も低下していた。しかしながら、処理 13 日後の DNA 量は更に 27% までに減少しているものの AOB 活性

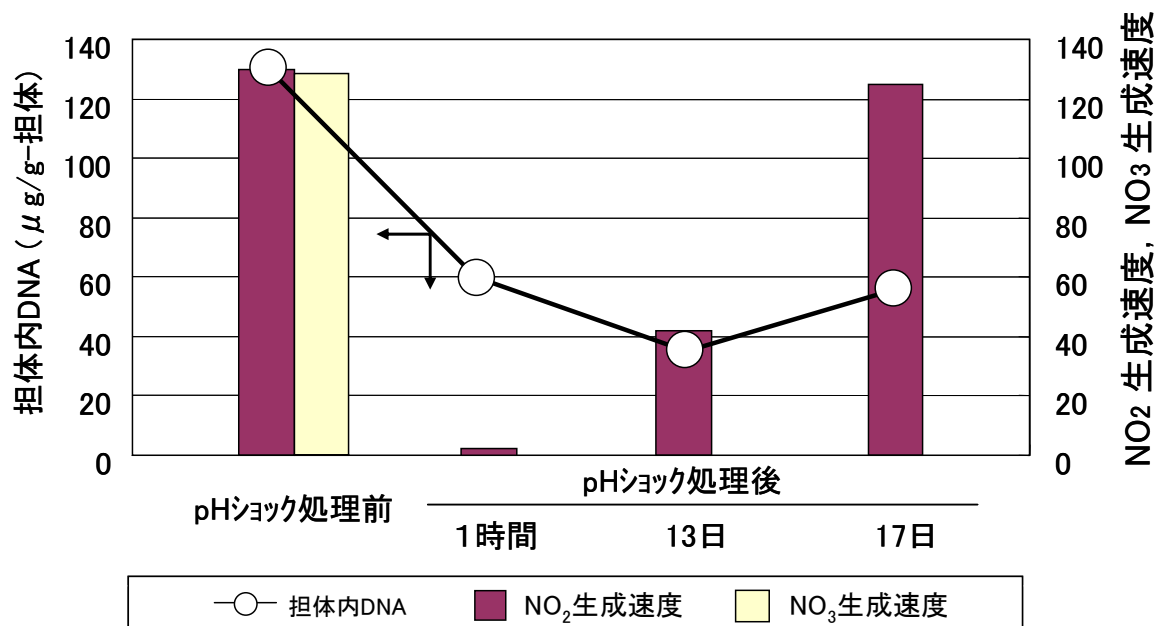


図 30 pH ショック処理による担体内 DNA 量の変化

細菌種名	
pHショック処理前	pHショック処理13、17日後
Nitrospira sp. (NOB)	-
Nitrosomonas sp. (AOB)	Nitrosomonas sp. (AOB)
bacterium TG141	Tuber borchii symbiont b-17BO
Bacteroidetes bacterium Mo-0.2plat-K3	Pseudoxanthomonas sp.
estrogen-degrading bacterium KC2	bacterium CAGY1
bacterium PE03-7G4	Rheinheimera chironomi
Chitinophagaceae bacterium HU1-GB11	Stenotrophomonas maltophilia
bacterium Ellin5114	Pseudomonas sp.
Adhaeribacter aquaticus	Flavobacterium sp.
Sphingobacteriales bacterium TP64	bacterium G14
Sideroxydans lithotrophicus	bacterium CYCU-0262
endosymbiont of Acanthamoeba sp. KA/E9	beta proteobacterium CDB21
Sphingobacteriales bacterium TP498	Cytophaga sp.
Tuber borchii symbiont b-17BO	Hyphomicrobium vulgare
	Simplicispira limi
	Sphingomonas sp. 86
	bacterium RBS4-66
	Rheinheimera sp. 114NP12
	Methylophilus sp. u33
	Acetobacter pasteurianus
	Acidovorax sp.
	Stenotrophomonas sp. IMER-B4-1
	bacterium rJ10
	Xanthomonas sp. XXL-1
	Stenotrophomonas sp. T116
	Flavobacterium aquatile
	Methylobacillus flagellatus
	Acinetobacter johnsonii
	rhizosphere soil bacterium RSI-24
	Fluviicola taffensis
	Stenotrophomonas rhizophila
	Hydrogenophaga sp.
	Stenotrophomonas sp. FB206

表 12 担体内細菌種名リスト

は上昇し、17 日後の DNA 量は 57%程度なのにも関わらず、pH ショック処理前とほぼ同等の AOB 活性 (127mg-N/L-担体・h) までに回復した。なお、pH ショック処理後の NOB 活性は完全に消失した。pH ショック処理により担体内 DNA 量が著しく低下しているにもかかわらず、高い AOB 活性が示され、この原因を探索するため、担体内細菌の DNA クローン解析により細菌種を特定した。解析した細菌種名のリストを表 12 に示す。

得られた細菌種リストから AOB は *Nitrosomonas* 属で, NOB は *Nitrospira* 属で構成されていた。そこで, 得られたクローン数から, AOB および NOB の pH ショック前後における相対量変化を解析した。得られた結果を図 31 へ示す。その結果, pH ショック処理 1 時間後, NOB の DNA は 92% 残存していたが, 13 日後には完全に消失していた。NOB は pH ショック処理直後にはほぼ死滅し, その直後は DNA のみが担体内に残留していたものとする。AOB は pH ショック処理後に 29% まで減少したものの, 17 日後に 54% にまで回復していた。この結果から, 担体内へ優占している NOB は pH ショック処理によって死滅し DNA を消失する一方, AOB の一部は生存し続け, 亜硝酸型硝化が維持されていることが明らかとなった。

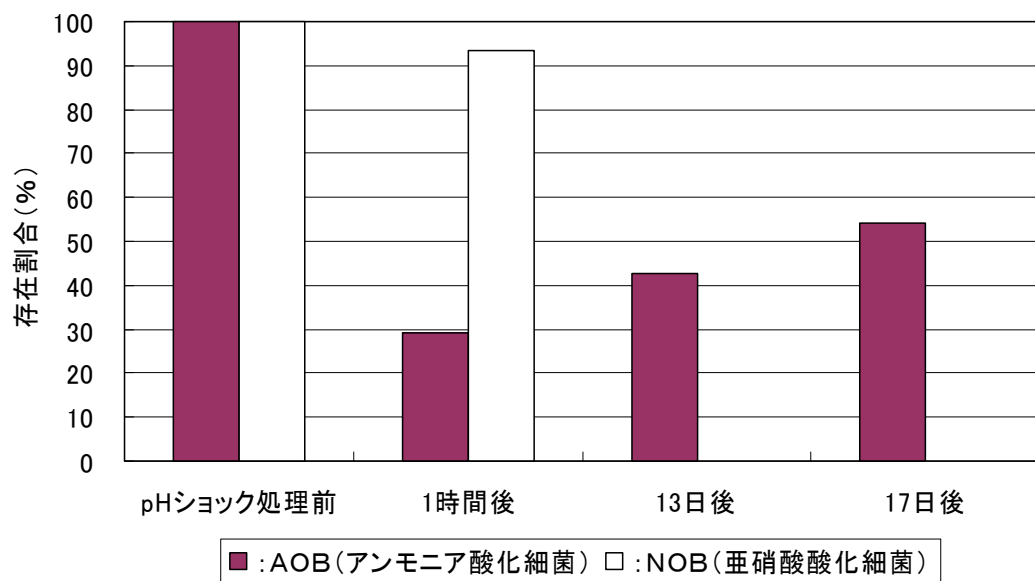


図 31 担体内の硝化細菌へ及ぼす pH ショック処理の影響

4) 消化汚泥脱水ろ液の連続亜硝酸型硝化処理

消化汚泥脱水ろ液を対象排水とし、亜硝酸型硝化処理装置による連続処理運転の立上げを行った。また、アルカリショック処理技術の適用条件として、アンモニア濃度について検討した。

1. 消化汚泥脱水ろ液

処理対象である消化汚泥脱水ろ液は、横浜市北部汚泥資源化センターよりご提供いただき、消化汚泥を遠心脱水工程後段から採取した。採取後、横浜市から一体処理型排水処理設備の設置場所である千葉県松戸市まで輸送し、原水冷却装置内にて冷蔵保存（10℃）し連続処理試験へ使用した。表 13 に採取した消化汚泥脱水ろ液の平均水質（2010 年 12 月～2011 年 3 月；n=4）を示す。一般に亜硝酸型硝化にはアンモニア濃度が高く、有機物濃度が低い水質の廃水が適していることが知られているが、平均アンモニア性窒素濃度（NH₄-N）は 1,000mg/L と高く、有機物由来の生物学的酸素要求量（C-BOD）は 33mg/L と低く、C-BOD /N 比が 0.033 と極めて低いことから本研究へ適した水質であることを確認した。

測定項目	平均濃度(mg/L)
懸濁物質(SS)	48
生物学的酸素要求量(BOD)	41
溶解性BOD	28
C-BOD	33
化学的酸素要求量(COD _{Mn})	120
溶解性COD _{Mn}	100
ケルダール窒素(Kj-N)	1,000
アンモニア性窒素(NH ₄ -N)	1,000
亜硝酸性窒素(NO ₂ -N)	0
硝酸性窒素(NO ₃ -N)	0
全りん(T-P)	60
リン酸態リン(PO ₄ -P)	59

表 13 消化汚泥脱水ろ液の平均水質

2. 消化汚泥脱水ろ液の亜硝酸型硝化の検討

試作した一体処理型排水処理設備を図 32 に示す。硝化槽（100L）を 2 系を配置し、担体引抜アルカリ処理装置を反応槽上部に設置している。



図 32 一体処理型排水処理設備

各種運転条件を表 14 に、硝化率制御概念図を図 33 に示す。後段のアナモックス反応の窒素反応比率 NO_2/NH_4 は 1.3 であることから、前段処理である亜硝酸型硝化反応の硝化率は 57% を安定維持する必要がある。

項目	条件
水理的滞留時間(HRT)	19～24時間
担体アルカリ処理	無し
反応有効容積	100L
担体充填率	10V/V%
攪拌方法	エアリフト方式
水温	30°C
pH	7.5

表 14 各種運転条件

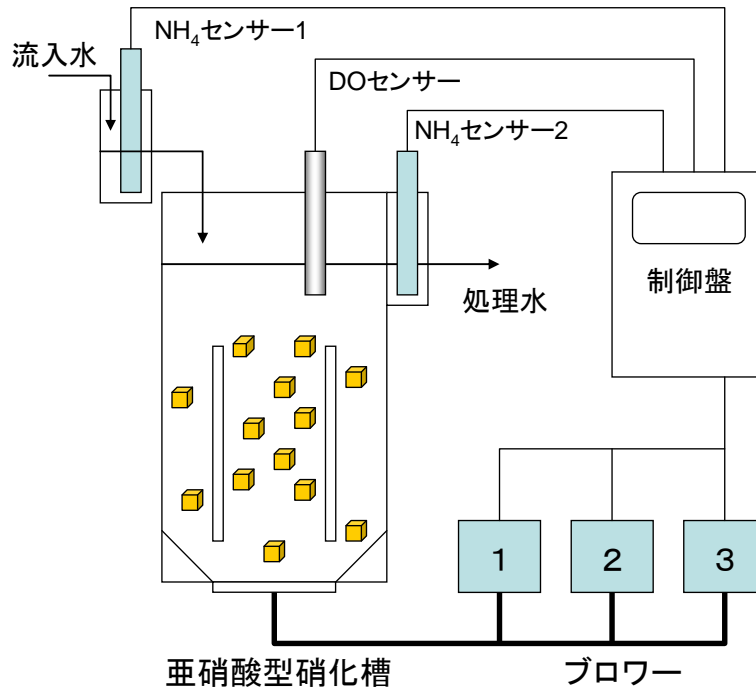


図 33 硝化率制御概念図

硝化率は 1) 式で求められる。

$$\text{硝化率} = \left(1 - \frac{\text{処理水NH}_4\text{-N}}{\text{流入水NH}_4\text{-N}} \right) \times 100 \quad \text{----- 1)}$$

本装置では NH₄ センサ 1, 2 の値から硝化率を算出し、硝化率が 56%未満であるときは溶存酸素 (DO) 濃度を 4.0mg/L に、56%以上57%以下では DO2.0mg/L に、57%よりも高いときは DO1.0mg/L になるよう、運転するブローワー台数を自動調節した。

得られた結果を図 34 に示す。硝化活性は約 10 日間で立ち上がり、亜硝酸生成速度は最大 0.79kg-N/(m³・日)まで上昇した。運転期間 350 日において、硝酸の生成は確認されず良好な亜硝酸型硝化を維持することができた。また、硝化率は 50~65%で制御され概ね安定した運転処理性能を確認した。残留アンモニア濃度が高く、良好な硝酸生成活性の抑制ができたものと考えられた。

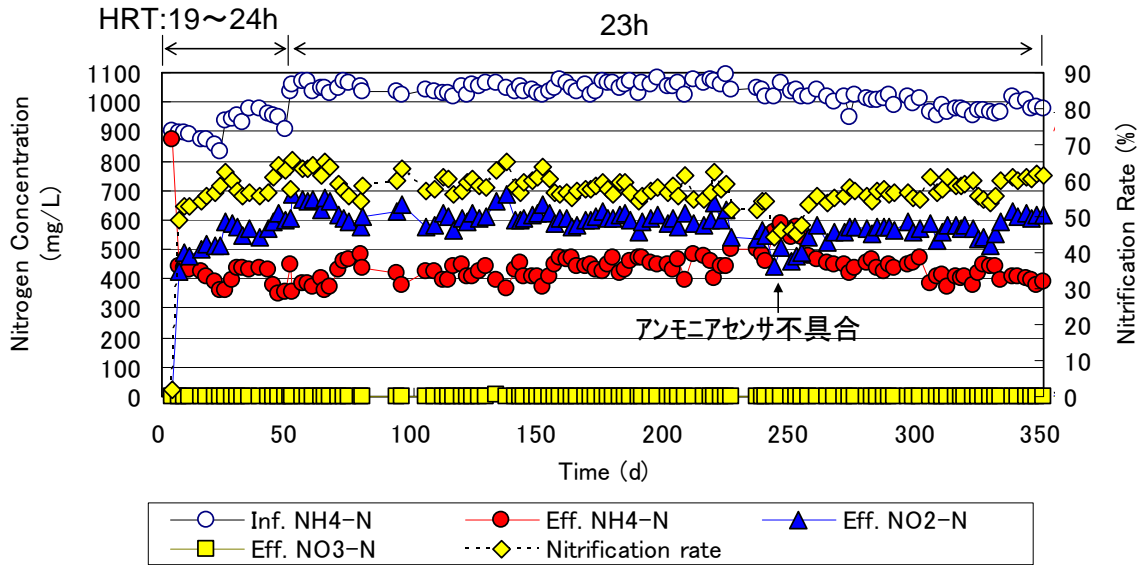


図 34 亜硝酸型硝化連続処理運転（消化汚泥脱水ろ液）

消化汚泥脱水ろ液はアンモニア濃度が極めて高いため、反応槽内に十分な遊離アンモニア濃度が確保できることから、pH ショック無しでも十分な硝酸生成活性の抑制が可能であることが実証された。よって、次に亜硝酸型硝化が可能な対象廃水のアンモニア濃度の検証について行うこととした。

3. 消化汚泥脱水ろ液希釈液の亜硝酸型硝化

図 33 に示す硝化槽と同型装置で硝化率制御を行わない実験系を用いて亜硝酸型硝化試験を行った。消化汚泥脱水ろ液を水道水で 5 倍希釈し硝化槽へ投入した。水温は 20°C で制御した。それ以外の条件は、上記亜硝酸型硝化連続処理運転と同等とした。実験結果を図 35 に示す。

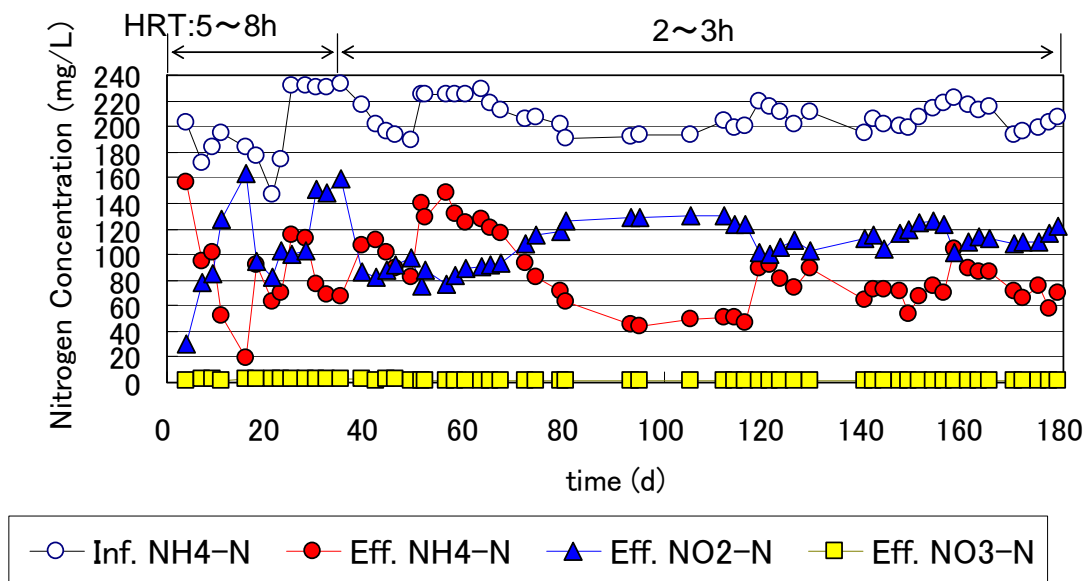


図 35 亜硝酸型硝化連続処理運転 (消化汚泥脱水ろ液 5 倍希釈)

その結果、硝化活性は約 2 週間で立ち上がり、その後約 165 日間に渡り安定した亜硝酸型硝化を実現した。硝酸の生成は全く確認されず、担体の pH ショックを行う必要はなかった。

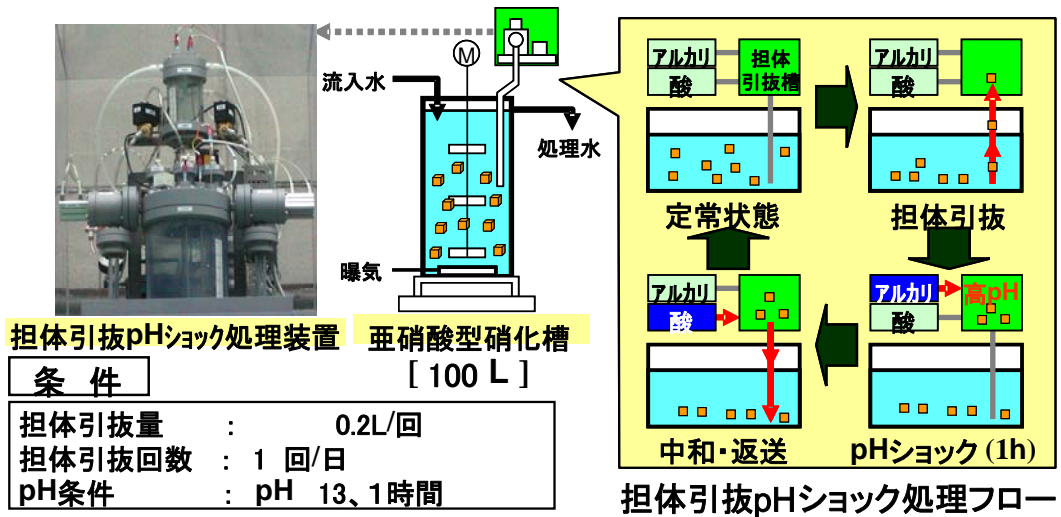


図 36 担体引抜き pH ショック装置の概念図

次に、原水 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が 80mg/L になるよう、消化汚泥脱水ろ液を更に水道水で希釈し反応槽へ投

入し、水温 20°C の条件で連続処理実験を行った。本実験では硝酸生成が予想されたことから硝化率制御を行わない図 33 に示す硝化槽の上部に担体引抜き装置を設置して連続処理実験を行った。図 36 に担体引抜き pH ショック装置の概念図を示す。担体の引抜き量は硝化槽充填担体の 2% とし、処理頻度は 1 日 1 回とした。pH13 の条件で 1 時間処理し、中和後硝化槽へ返送した。

得られた結果を図 37 に示す。

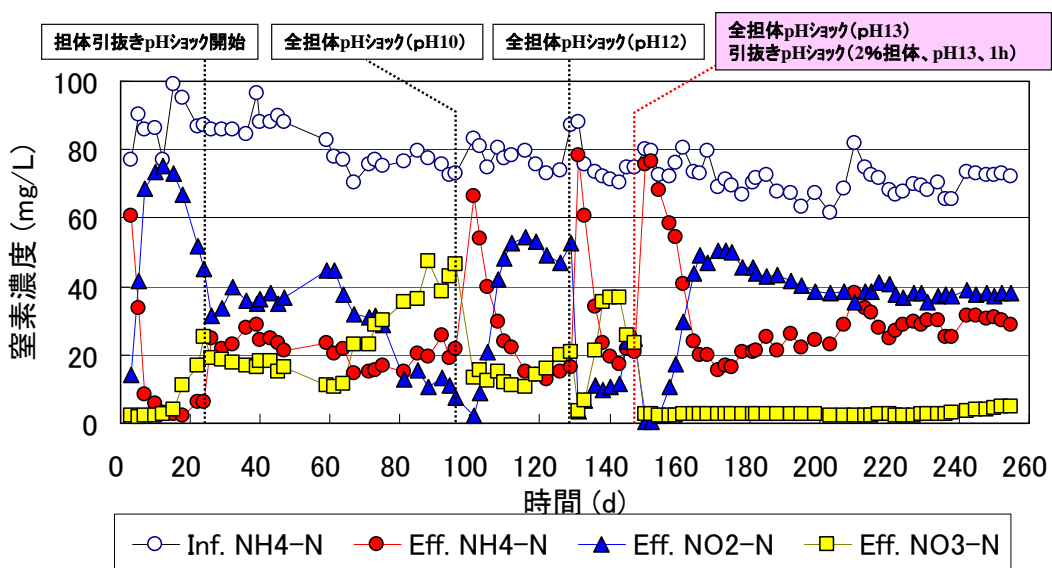


図 37 亜硝酸型硝化連続処理運転（消化汚泥脱水ろ液 12.5 倍希釈）

硝化活性は約 1 週間で立ち上がり、すぐに NO_3 生成が活性化したため、担体引抜き pH ショックを開始した。しかしながら NO_3 生成活性は抑制されたものの完全ではなかったため、全担体を引き抜いて pH10、pH12 の条件で、それぞれ 1 時間 pH ショック処理を行ったものの NO_3 生成活性を抑制するにはいたらなかった。そこで、運転 147 日目に全担体を引き抜いて pH13 の条件で 1 時間 pH ショック処理を行い、その後担体引抜き pH ショック処理を継続させたところ、ようやく NO_3 生成活性の抑制に成功した。約 90 日間の亜硝酸型硝化を安定することに成功し、低濃度アンモニア廃水でも pH ショック法により亜硝酸型硝化が十分可能であることを示すことに成功した。

2. 1. 6 亜硝酸型硝化における亜酸化窒素発生抑制

亜硝酸型硝化では、アンモニアの酸化を亜硝酸の段階で留め、硝酸への酸化を抑制することで酸素消費を削減する。しかしながら、亜硝酸蓄積により温室効果ガスの一つである亜酸化窒素 (N_2O) の発生が多くなるため、 N_2O の発生抑制が課題とされている。本研究では、合成廃水の硝化処理における pH ショック法による $\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4$ 転換率（除去された NH_4 の内 N_2O へ転換した割合）の変化と曝気風量の影響を解析し、また、pH ショック法による AOB の群集構成変化を検討した。さらに、実廃水の硝化処理における pH ショック法による $\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4$ 転換率の変化と槽内窒素濃度、有機物濃度の影響を解析した。さらに、硝化処理槽内の N_2O 発生メカニズム特定の手法開発に向けて、窒素の各種安定同位体から生成される N_2O を解析した。

1) ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-QMS) を用いたガス迅速測定法の開発

GC-QMS (GCMS-QP2010Plus, 島津製作所) を用い、高感度で一度に多種類のガスを測定する方法を開発した。特に大気の混入がないように GC-QMS システムの注入口と排出口を工夫した。さらに、これを応用してテドラーバッグからのガス採取方法と GC-QMS へのガス試料の注入方法を

改変し、以下の N_2O 分析にはこのシステムを用いた。

大気の混入がないように改変した GC-QMS システムの概略図を図 1 に示す。インジェクションポートを He ガスで囲み (図 38)、さらに He ガスで針先を洗浄したガスタイトシリンジを用いて He ガス内でガス試料を採取することによって大気の混入を防いだ。その結果、図 39 に示したように、試料中に混在する気体分子を分離して、それぞれを一度に感度高く検出することができた。

本方法をテドラーバッグ内のガス試料の採取にも応用した (図 40)。テドラーバッグのガス採取口にシリコンチューブとセプタムを取り付けて He ガスを流し (図 40a)、ガスタイトシリンジで採取したガスは He ガスで囲んだ GC-QMS セプタムインジェクションポートに注入することによって (図 40b) 低濃度の N_2O を検出した。

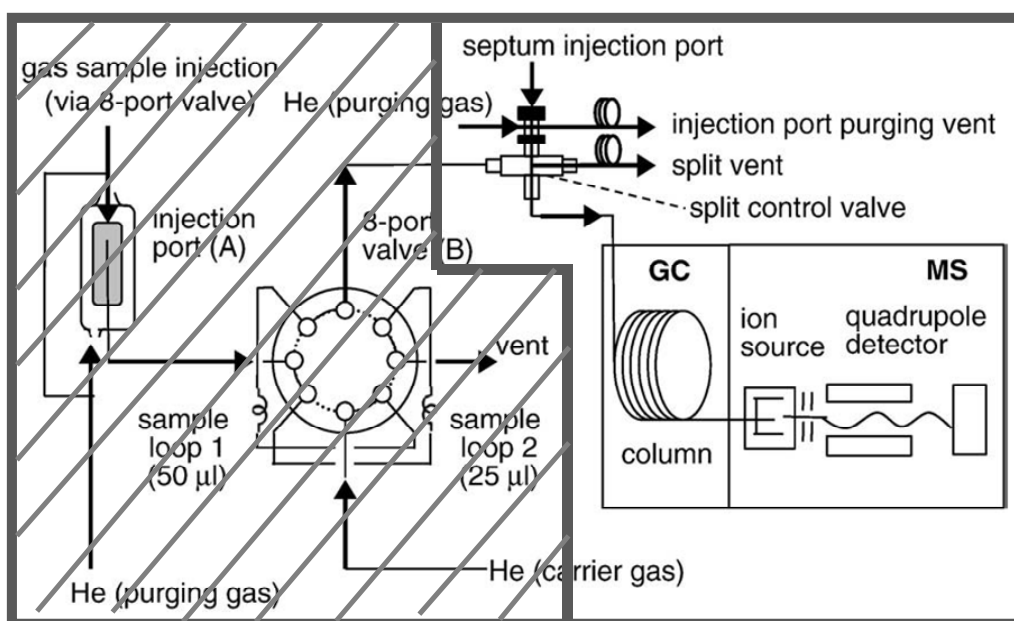


図 38 本研究で開発した GC-QMS システムの概略図 (Isobe et al. 2011 より抜粋)。今回の N_2O 分析においては斜線部を除くガス流路を使用した。

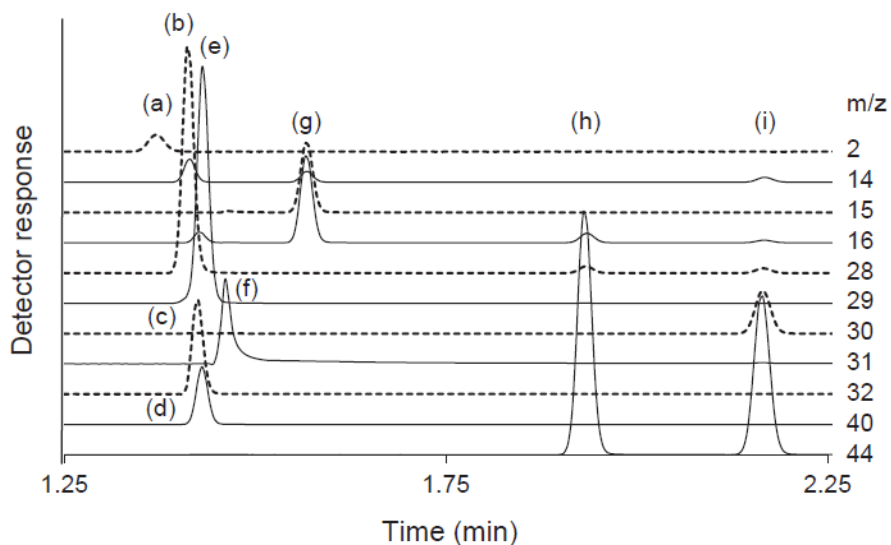


図39 9種類のガスのマスクロマトグラム (Isobe et al. 2011より抜粋) . Heガス中の H_2 (a, m/z 2), N_2 (b, m/z 14, 28), O_2 (c, m/z 16, 32), Ar (d, m/z 40), ^{13}CO (e, m/z 29), ^{15}NO (f, m/z 31), CH_4 (g, m/z 15, 16), CO_2 (h, m/z 28, 44), N_2O (i, m/z 30, 44).

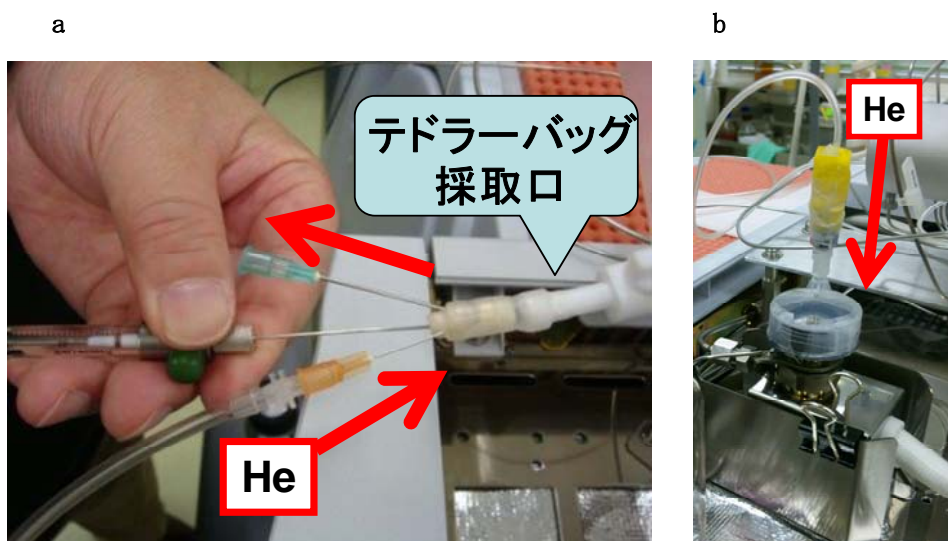


図40 テドラーバッグからのガス採取方法 (a) と GC-QMS インジェクションポートの周囲をHeガスで囲む様子 (b) .

2) 廃水の連続硝化処理と槽内ガスの採取（合成廃水処理）

NH₄-N 濃度を約 200 mg/L に調整した硫酸アンモニウムを主成分とする無機合成廃水を連続処理装置への流入水として使用した。反応容積 2 L の硝化槽を用いて無機合成廃水を連続処理した後、pH ショック（活性汚泥の固定化担体を pH 13 に 1 h 曝露）を行い再び連続運転を行った。定常運転条件は水温 17～18℃、HRT 7.5 h, pH 8, 曝気風量は 1.0 L/min・L-槽（DO 約 6 mg/L）とした。pH ショック前後の槽内の N₂O ガス分析のために、一時的に硝化槽を密閉し、槽上部とテドラーバッグを直結し漏出するガスを採取した。また、曝気風量の N₂O/NH₄ 転換率への影響を調べるため、pH ショック後の硝化活性が安定するのを確認し、風量を 0.40, 0.70, 1.0, 1.3, 4.0 L/min・L-槽へ変化させ、それぞれ風量変更 24 時間後の水質と排出ガスの分析を行った。

亜酸化窒素の発生量は、酸化されたアンモニア性窒素のうちどれだけが亜酸化窒素へ転換されたか、N₂O/NH₄ 転換率として算出した。1) 式に示す

$$\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{転換率}(\%) = \frac{(\text{発生N}_2\text{O-N量})}{(\text{流入NH}_4\text{-N量} - \text{残留NH}_4\text{-N量})} \times 100 \quad \dots\dots\dots 1)$$

合成廃水処理の pH ショック前後の硝化槽における N₂O/NH₄ 転換率の変化を図 41 に示す。pH ショック前の N₂O/NH₄ 転換率は 2.3～3.1%であったが、pH ショック直後に 0.15%以下まで低下し、AOB 活性が回復した後も pH ショック前よりも低い 0.88～1.4%を示した。また、運転 147 日目以降において、曝気風量を増減させ N₂O/NH₄ 転換率の変化を解析したが明確な相関は得られなかった（図 42）。よって、本実験条件においては、曝気風量にかかわらず pH ショック後の硝化反応で N₂O/NH₄ 転換率は低下し、N₂O 生成に係わる機構が pH ショックにより抑制されていることが示唆された。

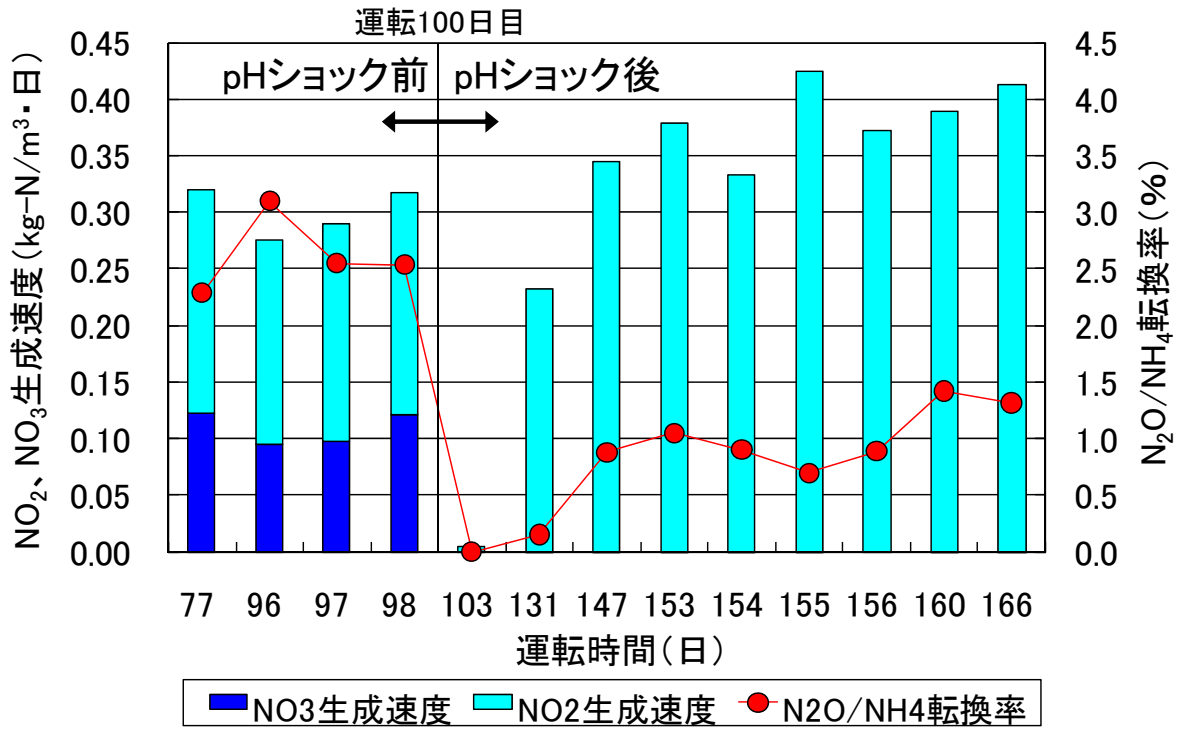


図 41 合成廃水処理槽における NO₂, NO₃ 生成速度と N₂O/NH₄ 転換率の変化

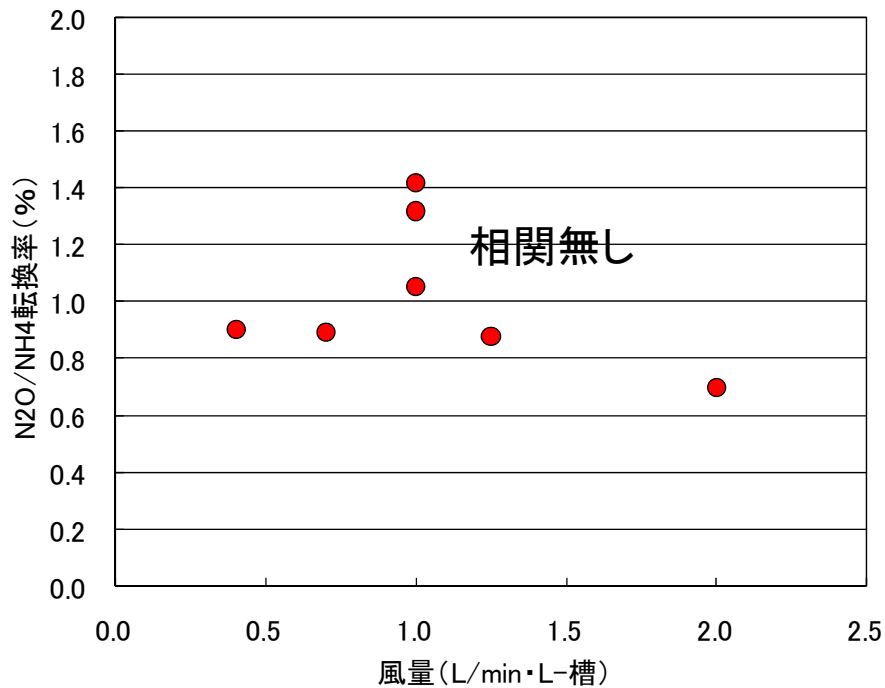


図 42 合成廃水処理における曝気風量の違いによる N₂O/NH₄ 転換率

3) 廃水の連続硝化処理と槽内ガスの採取（実廃水処理）

横浜市北部汚泥資源化センターの消化汚泥脱水ろ液の原液（ $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 1,000 mg/L）および希釈液（ $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 80 mg/L；原液を水道水で希釈）をそれぞれ連続処理装置への流入水として使用した。反応容積 100 L の硝化槽 2 系を用いて連続運転を行った。原液系は水温 30°C，HRT 23 h，pH7.5 とした。希釈液系は 20°C，HRT 3 h，pH7.5 とした。原液系は硝化槽へ設置したアンモニアセンサーを用い曝気風量を調節することで硝化率が 57% になるよう制御した。pH ショック前後の槽内の N_2O ガス分析のために、一時的に硝化槽を密閉し、槽上部とテドラーバッグを直結し漏出するガスを採取した。

実廃水処理（原液： $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 1,000 mg/L）の pH ショック前後の硝化槽における $\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4$ 転換率の変化を図 43 に示す。

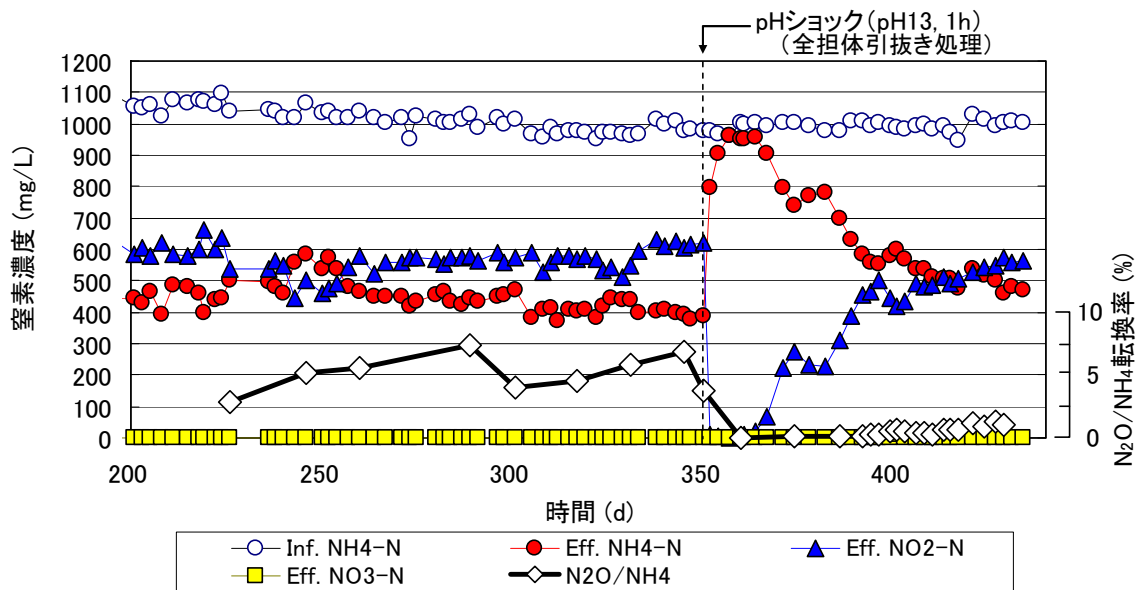


図 43 実廃水処理槽（原液： $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 1,000 mg/L）における各態窒素濃度と $\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4$ 転換率の経日変化

亜硝酸型硝化が約1年に渡って安定することを確認したが、運転226～350日目での平均 N_2O/NH_4 転換率は5.1%と高い値を示した。そこで槽内全担体をpHショック(pH13, 1h)処理した結果、 N_2O/NH_4 転換率がショック後に約0.3%に抑えられた。実廃水処理(希釈液: NH_4-N 約80 mg/L)での結果を図44に示す。pHショック(pH13, 1h)によりショック前に0.4～1.5%の N_2O/NH_4 転換率がショック後に0.2%以下に抑えられた。

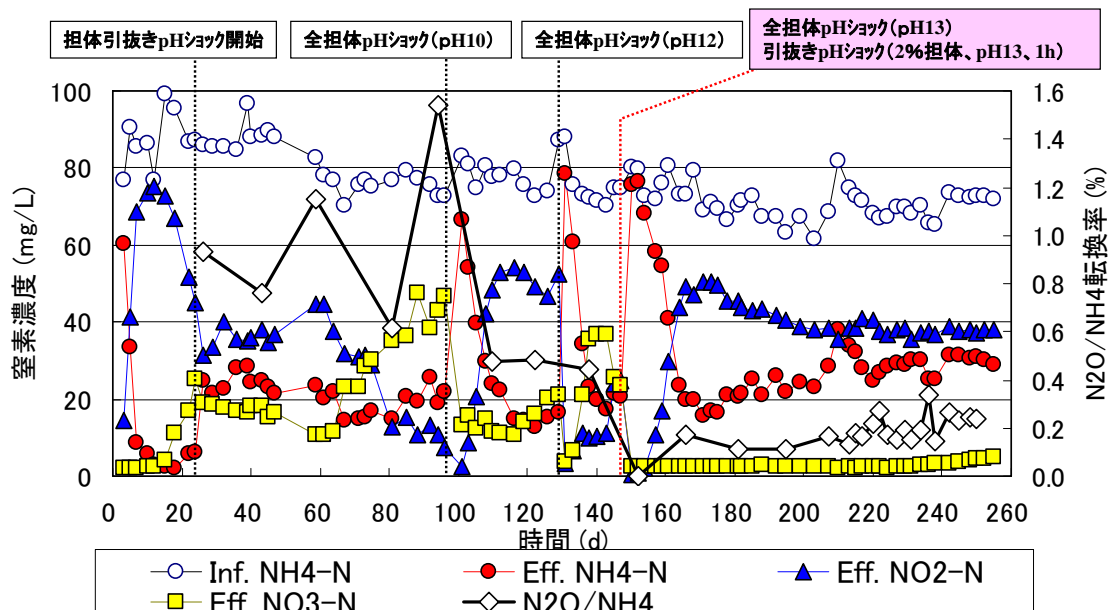


図44 実廃水処理槽(原液: NH_4-N 約80 mg/L)における各態窒素濃度と N_2O/NH_4 転換率の経日変化

各態窒素および炭素濃度と N_2O/NH_4 転換率の関係を図45に示す。その結果、pHショック前の槽内 NH_4-N 濃度、 NO_2-N 濃度、無機炭素(IC)濃度および全炭素(TOC)濃度と N_2O/NH_4 転換率との間に相関がみられた。 NO_3-N 濃度と N_2O/NH_4 転換率には相関がみられなかった。pHショック前はこれらの窒素濃度や炭素濃度のいずれかが、 N_2O/NH_4 転換率に影響を与えたと考えられる。ICが高いと硝化が促進され、 N_2O/NH_4 転換率は低いと予想されたがそうではなかった。また、希釈系処理槽では NO_3-N 濃度が高いほど硝化が進んでいると考えられるため、 NO_3-N

濃度が高いときは N_2O/NH_4 転換率が低いと予想されたが、希釈系処理槽では NO_3-N 濃度に対し、 N_2O/NH_4 転換率は横ばいであった。一方、pH ショック後には槽内窒素濃度および炭素濃度にかかわらず、 N_2O/NH_4 転換率は低減された。以上より、pH ショックを行わずに亜硝酸型硝化が安定している場合においても、pH ショックを与えることによって N_2O/NH_4 転換率の低減に一定の効果があることが示された

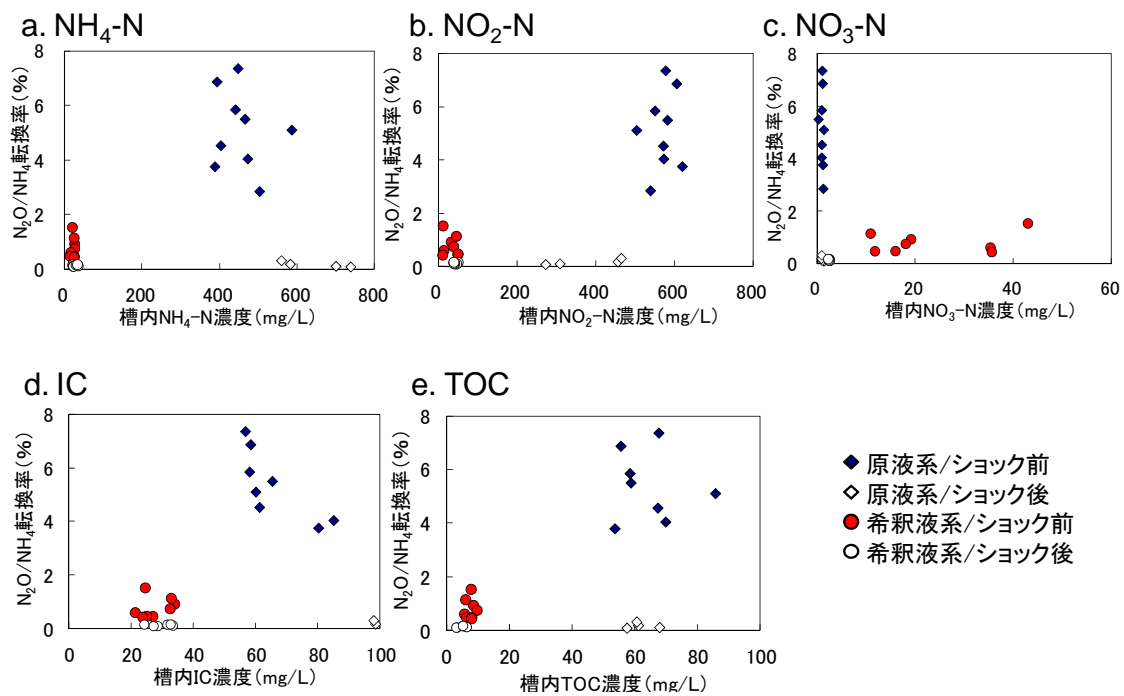


図 45 実廃水処理（原液： NH_4-N 約 1,000 mg/L）の pH ショック前後の槽内窒素および炭素濃度と N_2O/NH_4 転換率の関係。 NH_4-N 濃度 (a)、 NO_2-N 濃度 (b)、 NO_3-N 濃度 (c)、無機炭素 (IC) 濃度 (d)、全有機炭素 (TOC) 濃度 (e) と N_2O/NH_4 転換率の関係

4) pH ショック前後のアンモニア酸化細菌 (AOB) とアーキアの群集構成解析

細菌群集構成解析には、合成廃水処理における pH ショック前 (2010 年 11 月 12 日) と pH ショック後 (2010 年 12 月 17 日) の試料を用いた。AOB の解析には β -プロテオバクテリアの 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR プライマーペア CT0189fABC-CT0654r (Kowalchuk et al. AEM 1997, 63: 1489-1497) を用いた。より広範囲の AOB を検出するため、アニーリング温度は 55°C に加えて 45°C においても同様に解析した。アーキアの解析には報告されているアーキアの 16S rRNA 遺伝子あるいはバクテリアおよびアーキアの 16S rRNA 遺伝子を対象としたプライマーを組み合わせ、18 組のプライマーペアを試験した。18 組のうち目的断片長の増幅がみられた 5 組の PCR 産物についてクローニング-シーケンシング解析を行った (表 15)。

PCR 増幅産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。目的以外の増幅断片がみられる場合はアガロースゲルから抽出および精製した。精製した PCR 産物を TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) を用いてクローニングし、*Escherichia coli* One shot Top10 Competent Cell (Invitrogen) に形質転換した。得られた大腸菌クローンライブラリに対して目的の長さのインサートがプラスミドに組み込まれているか PCR によりインサートチェックを行った。インサートの DNA 塩基配列は外注分析 (株式会社ファスマック) により決定した。

		Reverse primer					
		Arc915r	Arc1059r	UA1204R	UA1406R	Univ907r	Univ1492r
Forward	Arc21F	-	-	-	-	-	-
primer	Arc109F	+M*	-	-	+M*	+	+
	Arc787f	not tested	not tested	not tested	not tested	+M	+M
	A571F	not tested	not tested	-	-	not tested	not tested
	A751F	not tested	not tested	-	+M*	not tested	not tested

表 15 アーキア 16S rRNA 遺伝子増幅のためのプライマーの組み合わせ

＋：目的断片長の増幅産物がシングルバンドとして検出された。

－：目的断片長の増幅産物が検出されなかった。

+M：目的断片長の増幅産物が検出されたが、非特異的な増幅による産物が混在した。

*：本研究で使用したプライマーペア。

RDP Classifier に基づく pH ショック前後の AOB 構成の結果を表 16 に示す。アニーリング温度の違い（45℃、55℃）による大きな構成の違いはみられなかった。pH ショック前後とも廃水処理系でよくみられる *Nitrosomonas europaea* に近縁な種が優占し、これらの菌株が pH ショック後に生残したことが示唆された。アーキアの群集構成では、シーケンス解析の結果増幅産物は細菌の 16S RNA 遺伝子が増幅したものであり、アーキアに相同な配列は検出されなかった。また、これらの細菌の配列には、*Proteobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Chloroflexi*

門、*Nitrospira* 門をはじめとする多様な分類群の配列が含まれた。よって、アンモニア酸化アーキア (AOA) を含むアーキアの合成廃水硝化処理槽内の存在量は、バクテリアと比較して低いと考えられる。実廃水処理 (希釈液: $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 80 mg/L) のように流入 $\text{NH}_4\text{-N}$ が低い系においてどのような AOB が優占し、どのような AOB が pH ショック後に生残するのかは、今後の課題である。

近縁種	アニーリング温度 45°C		アニーリング温度 55°C	
	前	後	前	後
<i>Nitrosomonas europaea</i> strain ATCC 25978	90	94	88	96
<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	2	0	2	0
<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm59	2	0	1	0
合計解析クローン数	94	94	91	96

表 16 合成廃水処理の pH ショック前後の AOB 構成クローン数

5) N_2O 発生メカニズム特定に向けた安定同位体トレーサー法の検討

廃水硝化処理槽内の N_2O 発生メカニズムとしては、AOB によるアンモニア酸化過程、AOB による脱窒 (硝化菌脱窒) 過程、脱窒菌による脱窒過程、化学的変換が主な発生源として考えられる。このメカニズム特定の手法開発に向けて、安定同位体トレーサーを用いた AOB 純粋分離株 (富栄養性 *Nitrosomonas* sp. GH22 株、貧栄養性 *Nitrosomonas* sp. AL212 株) の培養と生成 N_2O の GC-QMS 分析を行った。 NH_4Cl および NaNO_2 の各種同位体試薬を培地に添加し (終濃度 $\text{NH}_4\text{-N}$ 84 mg/L、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 15 mg/L)、AOB 懸濁培地をバイアル瓶に封入して好気条件でバッチ培養した。バイアル瓶のヘッドスペースガスを経時的に GC-QMS 分析し、生成される N_2O を解析した。さらに、アンモニア酸化の中間代謝産物であるヒドロキシルアミン (NH_2OH) と NO_2 から N_2O が生成されることが知られているため、その化学的な生成のポテンシャルを調べるために、 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ と NaNO_2 の各種同位体 ($^{14}\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ と $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ 各終濃度 14 mg-N/L) を無菌培地に添加してバイアル瓶に封入し、好気および嫌気条件においてバイアル瓶のヘッドスペースに生成される N_2O

を解析した。

安定同位体トレーサー法を用いた AOB 培養における N_2O 生成の実証例 ($^{14}NH_4Cl$ 84 mg-N/L と $Na^{15}NO_2$ 15 mg-N/L を添加した培地で好気培養した場合) を図 46 に示す。AOB 純粋分離株は、4. で合成廃水において優占した *Nitrosomonas europaea* と同じグループに入る富栄養性の *Nitrosomonas* sp. GH22 株に加え、貧栄養性の *Nitrosomonas* sp. AL212 株を用いた。AL212 株は下水処理場の活性汚泥での優占種と一般にみなされている *Nitrosomonas* Group 6a に属し、その代表的な菌株として国際共同研究で全ゲノムが解読された。この菌株を保有するのは我が国 (中央大学) だけである。この検討により検出された N_2O の N には NH_4 由来のものと NO_2 由来のものが含まれ、安定同位体トレーサーを使用することにより、それらを分別できることが実証された。本実験条件では、アンモニア酸化に加え、硝化菌脱窒も行われたことが示唆され、GH22 株は AL212 株よりも硝化菌脱窒活性が低いと考えられる。本研究で集積された *Nitrosomonas europaea* 群がこの結果と同様に下水汚泥のアンモニア酸化細菌よりも硝化脱窒経路の N_2O 生成が低いなら、開発システムのアドバンテージは高く、この予備的検討結果はこの課題への実証研究の動機づけとなろう。また、アンモニア酸化の中間代謝産物として知られる NH_2OH と NO_2 を無菌培地において好気条件で培養した場合、 NH_2OH と NO_2 から一分子ずつの N を持つ N_2O が化学的に生成されるポテンシャルがあることを示した。

様々な安定同位体トレーサーを用いた培養実験を廃水処理条件により近い条件で行えば、硝化処理において検出される N_2O の発生源および発生メカニズムの特定につながると考えられる。

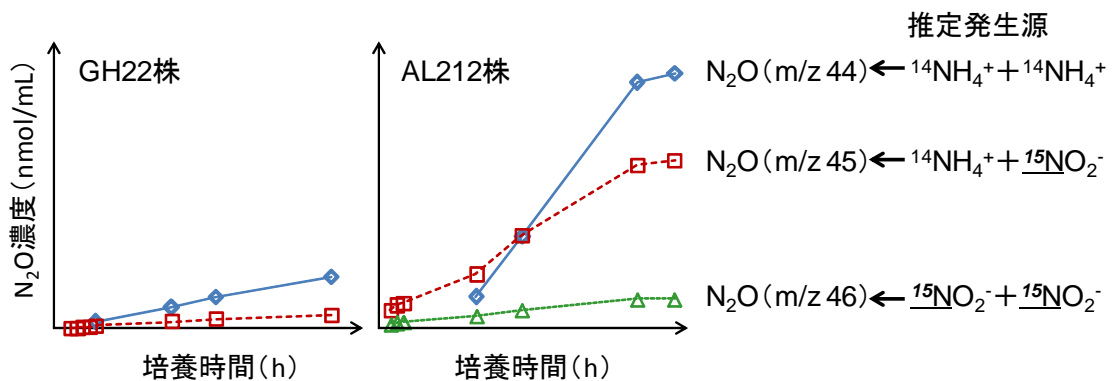


図 46 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ と $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ を添加して AOB を培養した場合に生成される N_2O の例

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.

James A. Mueller, William Charles Boyle, H. Johannes Pöpel: Aeration principles and practice: Water quality management library, 11. (2002)

北谷道則：活性汚泥生物の必要酸素量から考察した空気量削減方法：横浜市環境創造局，
<http://www.city.yokohama.jp/me/kankyou/data/gesui/>

Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. and Strous, M.: New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater: FEMS Microbiol., 27, pp.481-492 (2003)

Kuai L. and Verstraete W.: Ammonium removal by the Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system: Applied and environmental microbiology, 64, No. 11, pp. 4500-4506 (1998)

小笠原多佳子, 中村裕紀, 角野立夫：高濃度アンモニア廃水の亜硝酸型硝化・脱窒処理の検討：衛生工学シンポジウム論文集 5, pp. 146-150 (1997)

Kazuo Isobe, Keisuke Koba, Shingo Ueda, Keishi Senoo, Shigeaki Harayama, Yuichi Suwa. A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. *Journal of Microbiological Methods* (2011) 84; 46-51.

IV. 実用化、事業化の見通しについて

1. 実用化、事業化の見通しについて

1. 2 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)

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)

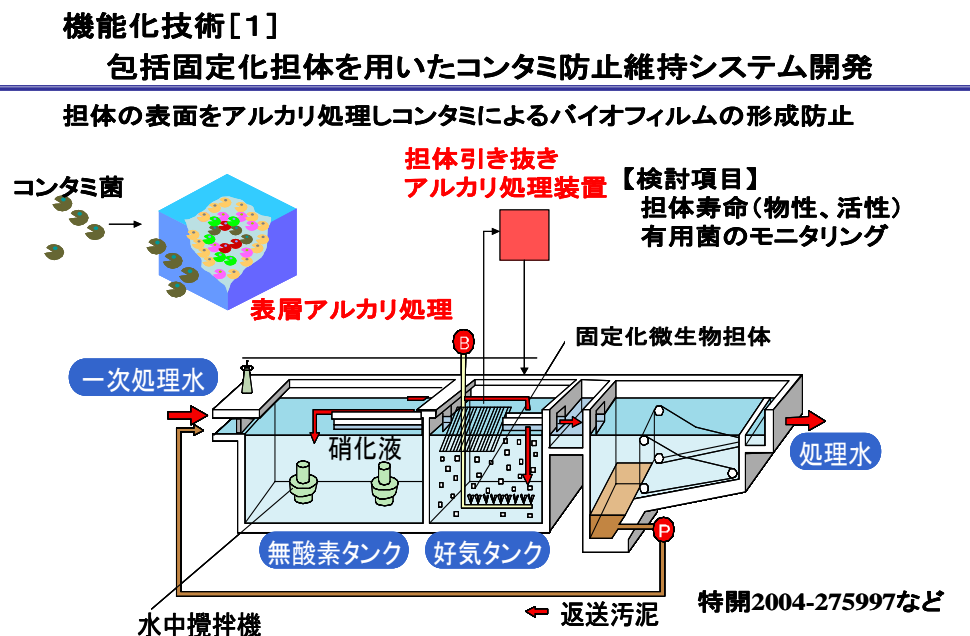


図1 包括固定化担体を用いた実用化概念図

(添付資料)

・特許論文リスト

(1) 研究論文・講演 4件

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
1	生田 創 角野 立夫	(株)日立プラントテクノロジー	廃水処理の曝気量低減に向けた基礎的検討	第43回日本水環境学会 年会講演集,2009,69	有 or 無	2009年
2	生田 創 角野 立夫 原山 重明 諏訪 裕一	(株)日立プラントテクノロジー	Reducing Aeration requirement for Biological Wastewater Treatment	The 3rd IWA-ASPIRE Conference & Exhibition 2009(Taipei),150		2009年
3	生田 創 角野 立夫 原山 重明 諏訪 裕一	(株)日立プラントテクノロジー	pH ショック法を用いた亜 硝酸型硝化技術の検討	日本水処理生物学会 第46回大会(高知大会) 日本水処理生物学会誌 別巻第29号,2009,56		2009年
4	KEYA Chaman Ara 諏訪裕一 原山重明 生田 創 角野立夫	中央大学	活性汚泥構成菌の内生 呼吸	日本水処理生物学会 第46回大会(高知大会) 日本水処理生物学会誌 別巻第29号,2009,63		2009年
5	生田 創 角野立夫 原山 重明 諏訪 裕一ら	(株)日立プラントテクノロジー	pH ショック法による亜硝 酸型硝化システムの評価	第44回日本水環境学会 年会講演集,2010,503		2010年
6	原山 重明 諏訪 裕一ら	中央大学	A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites.	Journal of Microbiological Methods (2011) 84; 46-51.		2011年
7	生田 創 諏訪 裕一 勝山 知恵 原山 重明ら	(株)日立プラントテクノロジー	亜硝酸酸化活性に及ぼ す遊離アンモニアの影響 評価	第45回日本水環境学会 年会講演集,2011,36		2011年
8	勝山 知恵 諏訪 裕一 原山 重明 生田 創ら	中央大学	亜硝酸型硝化プロセスに おける亜酸化窒素発生抑 制条件の検討	第45回日本水環境学会 年会講演集,2012,37		2011年
9	勝山 知恵 諏訪 裕一 原山 重明 生田 創ら	中央大学	亜硝酸型硝化処理にお ける亜酸化窒素発生の 評価	第46回日本水環境学会 年会講演集,2012,42		2012年

(2) 特許等 なし

(3) 受賞実績 なし

2.2 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)

2.2.1 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 が生成され大気に分散される。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解込み、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。

2.2.2 嫌気性処理水に溶存しているメタンの酸化分解

2.2.2.1 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 0.28 kg CO₂·m⁻³ である。一方、溶存メタンの揮散量を CO₂ に換算すると 0.37 kg 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。

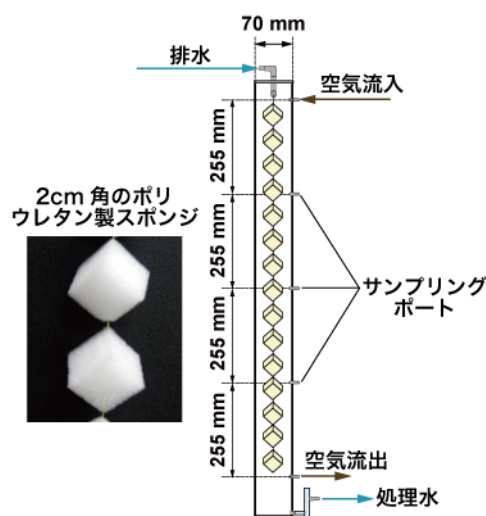
2.2.2.2 研究目的および目標

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。

2.2.2.3 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。メタンガスでバ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、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 L·day⁻¹、phase 2 (day 61-128): HRT 2 時間、空気供給量 2.5



III-2-2-2 図1 実験に用いた DHS リアクターの概要

L·day⁻¹、phase 3 (day 129-204): HRT 1 時間、空気供給量 2.5 L·day⁻¹、phase 4 (day 205-): HRT 0.5 時間、空気供給量 2.5 L·day⁻¹、の条件で 20℃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 m³·m⁻³·day⁻¹) 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

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事から、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、メタノール酸化性細菌である *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

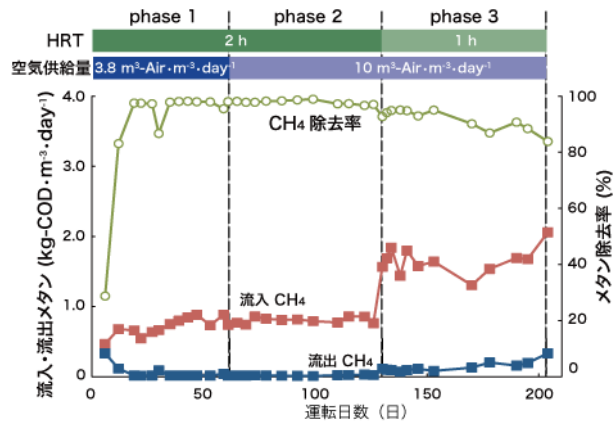


図2 DHSリアクターの運転条件とメタン除去性能

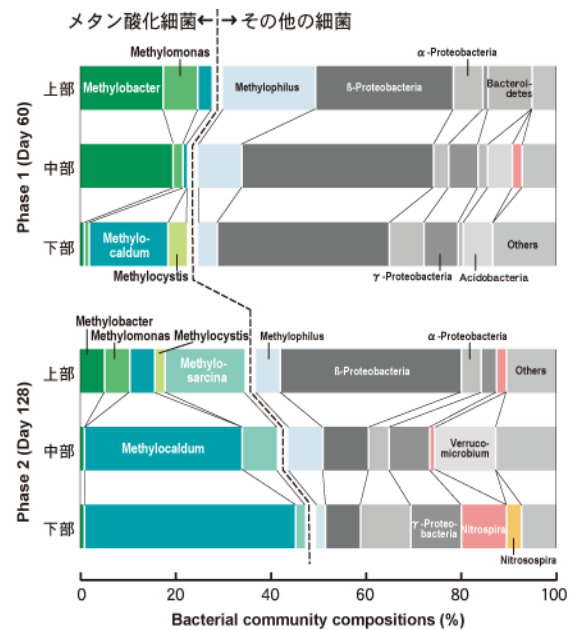


図3 DHS リアクター保持汚泥の16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析結果。細菌を標的としたプライマーセット (EUB338-1492R) を使用。

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。

2.2.2.4 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) の検討が済めば、実排水に適用できると考えられる。

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)を試算すると以下ようになる。

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5m)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5m、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。

2.2.3 N₂O ガス分解 DHS リアクターの開発

2.2.3.1 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)。嫌氣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 N_2O は脱窒反応の過程により N_2 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。 N_2O 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 N_2O 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。

2.2.3.2 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。

2.2.3.3 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 $25^\circ C$ 、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。このことから、 NO 等の中間代謝物が蓄積している可能性が考えられた。

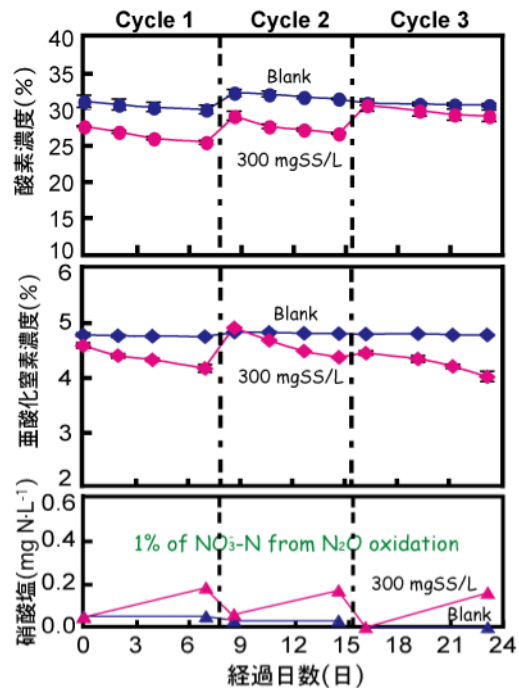


図4 好气的条件下で亜酸化窒素分解微生物の集積培養実験の結果

連続培養実験は高さ 60cm のベンチスケール DHS リアクターを用いて、溶存 N_2O を流入し実験を行った。一年にわたる運転期間中、 N_2O と O_2 の減少が継続して確認されており、また、運転日数を重ねるごとに減少量が増加したことから、微生物作用的な反応であることが確認できた。しかしながら、基質供給量を段階的に増やして運転を行ったところ、流出水から検出されていた NO_3^- が消失し、かわりに窒素ガスの生成量が増加するといった現象が見られた。連続培養実験終了時にスポンジ担体バイオマスに対して行った細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析では、アンモニア酸化古細菌 (AOA) や *Nitrospira* 属の亜硝酸酸化細菌に近縁なクローンが検出された。AOA については古細菌クローンライブラリーの90%以上を占めていた。 N_2O 以外の窒素源の供給は無かったにもかかわらず、これだけのポピュレーションを維持するためには、 N_2O 分解に何かしら関与してエネルギーを得ていると考えられ、AOA が N_2O を NO_3^- に酸化していることが示唆された。

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、 $30^\circ C$ 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气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、全ての培養系で嫌气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

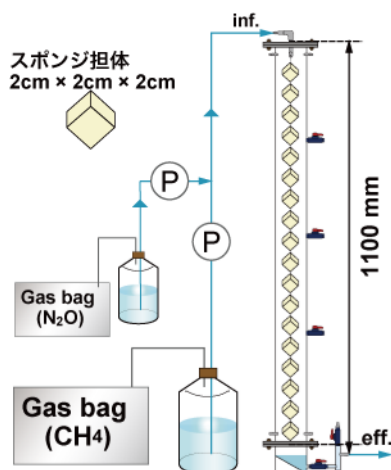


図5 メタンを用いた亜酸化窒素除去実験に用いたDHSリアクターの概略。DHSリアクターは直径68mmの円筒形カラムで、その内部にスポンジ担体を吊るしている。

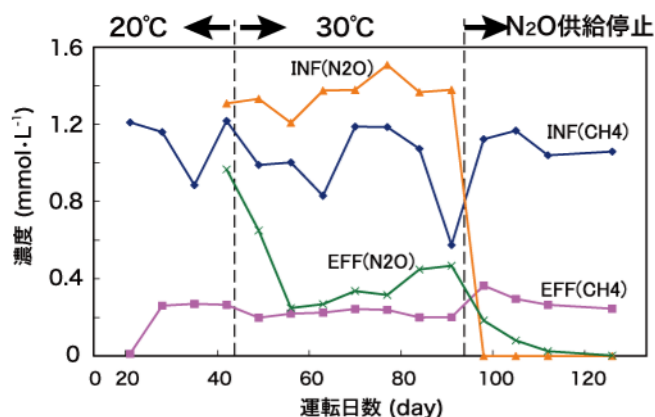


図6 DHS リアクターを用いた亜酸化窒素ガス分解実験の結果。実験は温度条件およびガスの供給条件を変更して行い、メタンをもちいた亜酸化窒素の脱窒性能を調査した。

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、N₂O 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6)。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。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、充滿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、嫌気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。この嫌気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。

2.2.3.4 研究成果

嫌気的 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。これら対照実験の結果から、生物学的な作用による N₂O の酸化除去ができることが確認できた。好氣的 N₂O 酸化分解反応はアンモニア酸化古細菌の関与が強く示唆されたが、窒素の収支が取れておらず、代謝経路の解明までには至らなかった。

これまでの研究で得られた結果を基にして、N₂O 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)を試算すると以下ようになる。

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 N₂O になっていると報告されている⁵⁾。この N₂O 放出量は CO₂ 換算で 0.0598-1.23 Kg-CO₂・m⁻³ である。一方、この従来型のプロセスに、高さ5m の DHS リアクターを増設し発生する N₂O の90%を除去したとすると、プロセス全体の CO₂ 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、0.0142-0.131 Kg-CO₂・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 N₂O 除去 DHSリアクターを付加する事で CO₂ 排出量は従来比1/4~1/9に削減できる。

2.2.4 リン除去・回収 DHS リアクターの開発

2.2.4.1 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。

2.2.4.2 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きない。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。

2.2.4.3 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

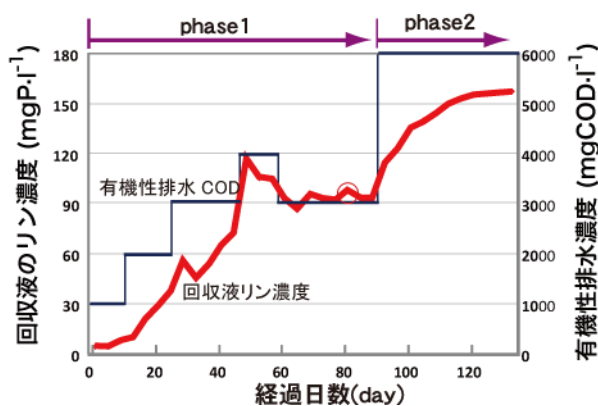


図8 DHSリアクターを用いたリン高濃度化の結果

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(H21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8)。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・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9)。さらに、汚泥中の微生物を16S rRNA 遺伝子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10)。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。以上を踏まえると、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。

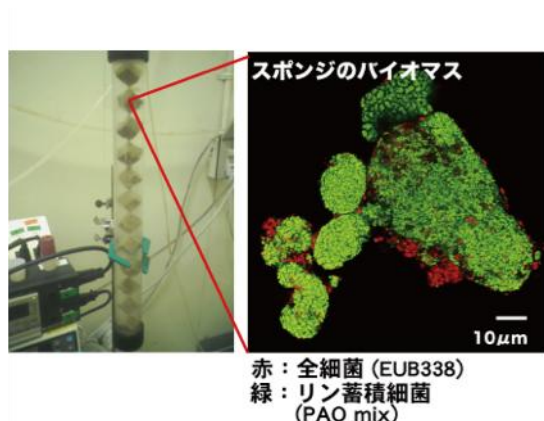


図9 ベンチスケールリン回収 DHSリアクター(左)と DHS リアクターより採取した汚泥を用い、リン蓄積細菌を標的とする PAOmix プローブで FISH を行った結果(右)

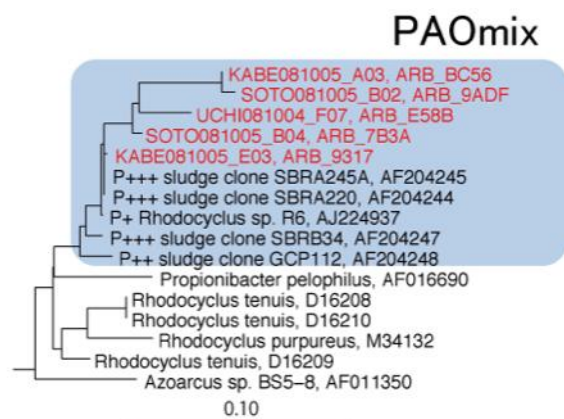


図10 ベンチスケールリン回収 DHSリアクターより採取した汚泥を細菌の16S rRNA 遺伝子を標的としてクローン解析を行った結果。赤字は本研究で得られたクローン配列で、系統解析の結果、*Rhodocyclus* 属に属したものを示している。

2.2.4.4 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なになる。

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。

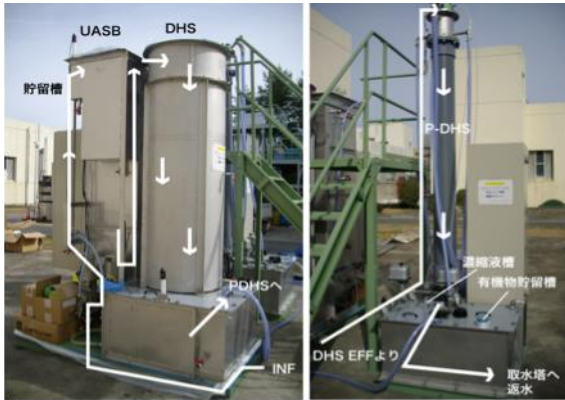
2.2.5 パイロット規模装置による実下水からのリン回収の実証試験

2.2.5.1 研究目的および目標

上述のラボスケールでのリン濃縮実験の成果を受けて、実下水からのリン回収の実証試験に取り組んだ。リン含有処理水を供給するための UASB-DHS システムと共に、リン除去回収 DHS リアクターを東広島浄化センターの敷地内に設置した。室内実験と同様に、リン濃度 $100 \text{ mg-P} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上の濃縮液の取得、そして、実下水処理の運転を通してのリン除去・回収性能を向上させるノウハウの蓄積と運転・操作方法の確立を目標に掲げて実験を行った。

2.2.5.2 研究内容

前段の UASB-DHS システムは、容積 100L の沈殿槽、容積 500L の UASB リアクター、有効容積 (スポンジ担体充填容積) 250L の DHS リアクターで構成されている (図 11 左)。処理水量は 1



下水処理 UASB-DHS システム リン除去回収 DHS システム

図11 東広島浄化センター内に設置したパイロット規模のリン回収実験装置。(左) リン含有処理水を供給するための UASB-DHS システム。(右) リン除去・回収 DHS リアクター。

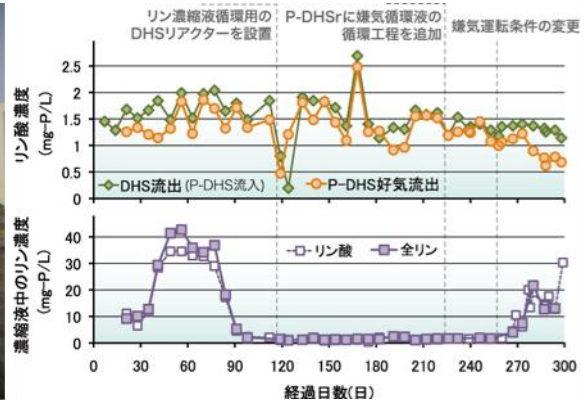


図12 好気運転時のリン除去性能（上）および、濃縮液槽のリン濃度（下）の経日変化。破線部は後述する運転条件の切り替えを示している。濃縮液中の大部分は溶存態のリン酸であることが下部のグラフからは読み取れる。

$\text{m}^3 \cdot \text{day}^{-1}$ として UASB で HRT12 時間、DHS で HRT6 時間かけて処理された後、後段のリン除去・回収 DHS リアクターへと供給される。実証試験期間中の流入下水の有機物濃度は COD_{Cr} で $266 \pm 58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、BOD で $171 \pm 39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ であったが、DHS リアクター通過後はそれぞれ $36 \pm 13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (除去率>90%)、 $14 \pm 12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (除去率>92%)であり、後段のリン除去・回収 DHS リアクターに適した良好な処理水質が得られた。

リン除去回収 DHS リアクターは高さ 2.2 m、有効容積 66 L の円筒容器に、中抜き円筒型の布担体（ポリエステル製）を有効容積 5 L で充填している。流入排水の滞留時間はリアクター容積で 1 時間、担体容積で 7.2 分である。運転開始初期は好気運転 9 時間（前段の UASB-DHS システム 処理水の供給）、嫌気準備運転 2 分（有機物含有溶液と貯留していたリン濃縮液の供給）、嫌気運転 2 時間 55 分（前述の混合液をリアクター内に満たす）、好気準備運転 3 分（濃縮液の再貯留）、以上の 4 工程を 1 サイクルとして運転を行った。この浄化センターの流入下水は一般的な都市下水と比べて、硫酸イオン濃度が $400 \sim 600 \text{ mgSO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ と 10 倍程度高く、一方で、リン濃度は $1 \sim 2 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$ と比較的希薄という性質があった。リン除去回収 DHS リアクターの好気運転時のリン除去・濃縮性能は、図 12 に示した通りである。好気運転時では、多少の変動はあるものの運転全期間を通してリン除去が進行していたことが見てとれる（図 12 上）。リン濃縮液については、運転 30 日目以降において流入リン濃度の 10 倍以上の当たる $30 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度の濃縮が確認された（図 12 下）。しかしながら、運転 80 日目付近からリン濃縮性能は急激に悪化して、運転 270 日目以降に再び上昇するまでの間、リン濃縮は全く見られなかった。この期間中に、①濃縮液循環 DHS リアクターの設置、②嫌気運転開始時の攪拌工程の追加、③嫌気運転条件の変更、の3点について改善を行った。

①濃縮液循環 DHS リアクターの設置：リン濃縮がみられなくなった運転 90 日目以降、濃縮液中に多量の黒色固形物が観察されるようになり、また、嫌気運転時および濃縮液槽内で硫酸還元反応が卓越して進行している可能性が強く示された。これを受けて、硫酸還元反応の抑制するた

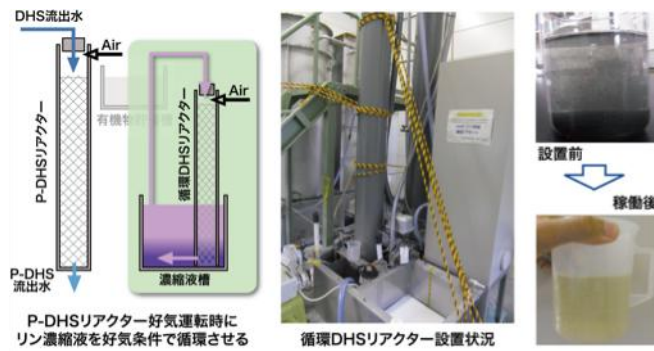


図13 濃縮液槽に設置した循環 DHSリアクターの概要図(左)と、実際の設置状況の写真(中央)および、濃縮液の視覚的状態の写真(右上、設置前; 右下、稼働後)。

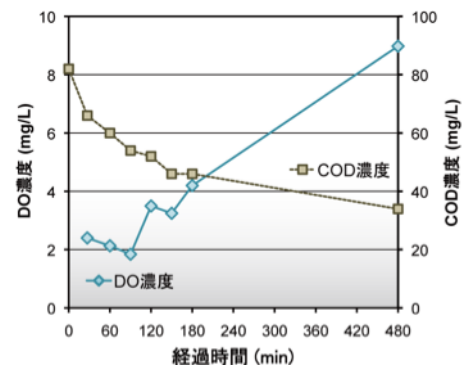


図14 循環 DHS リアクター稼働後の濃縮液槽内の DO 濃度と COD 濃度のプロファイル。

めに濃縮液を好気環境下にして残存有機物の除去を目的とした、循環 DHSリアクターを設置した(図13)。この DHS リアクターはスポンジ担体を有効容積 11.2 L で充填しており、60 L の貯留されたリン濃縮液を9時間(リン除去・回収 DHSリアクターの好気運転時間と一致する)かけて処理する(HRT: 1.7時間)仕様とした。循環 DHSリアクターが稼働してまもなく、濃縮槽内の黒色沈殿物の大部分は除去され、透明度の高い濃縮液を得ることができた(濃縮液の精製を達成)(図13右)。また、循環 DHS リアクター稼働後は、濃縮液槽内の DO 濃度の上昇および COD 濃度の減少がプロファイル結果から確認されており(図14)、濃縮液の好気処理が達成されていることが示された。

②嫌気運転開始時の攪拌工程の追加:リン濃縮性能の向上がみられない原因究明として、リン除去・回収 DHS リアクターに対して行った多くのプロファイル測定の結果より、嫌気運転開始時に投入した有機物が高さ方向で濃度勾配を形成しており、リアクター全体が有効に機能していない可能性が示された。そこで、嫌気準備運転時に投入した有機物の攪拌工程を追加したところ、攪拌工程後におけるリアクター内の COD 濃度は以前より設定値に近い値となり、リアクター内に均一に有機物が供給されるようになったことが示された(図15)。

③嫌気運転条件の変更:嫌気運転時間におけるリン除去・回収リアクター内の DO 濃度および

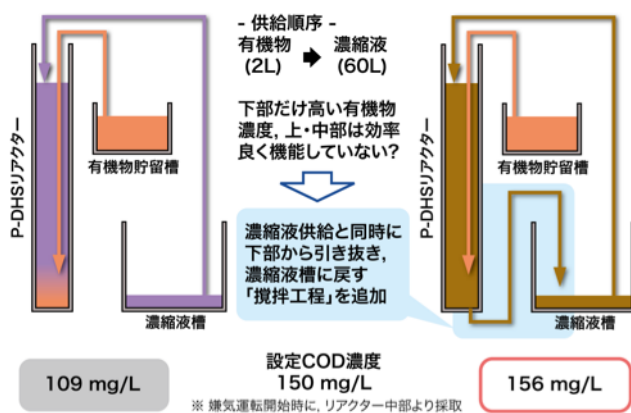


図15 嫌気運転開始時に追加した投入有機物攪拌工程の説明図。攪拌工程追加後(右側)では、追加前(左側)よりも設定値に近い COD 濃度調整ができた。

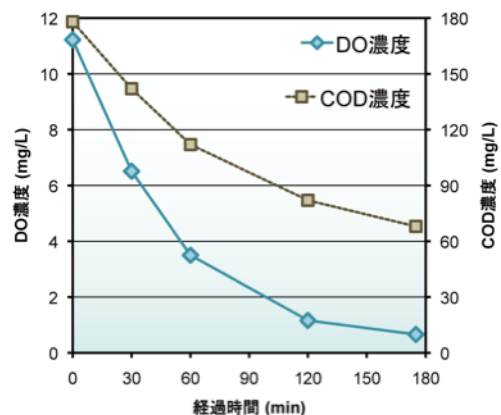


図16 嫌気運転時のリン除去・回収 DHS リアクター内の DO 濃度および COD 濃度の経時変化。

COD 濃度のプロファイル結果より、嫌気運転終了時においても $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 近い溶存酸素が残存しており、嫌気条件になっていないことが示された (図 16)。そこで、十分な嫌気条件の確保のために、嫌気運転時間を3時間から4時間に延長し、また、投入有機物量も1.5倍に増やした。その結果、運転 260 日目付近から濃縮液中のリン濃度に上昇傾向がみられ (図 14)、その後 $30\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度までのリン濃縮が確認された。

2.2.5.3 研究成果

パイロット規模のリン除去・回収 DHS リアクターを用いた実下水からのリン回収実証試験より、実用化に向けたリン除去・回収性能を向上させるノウハウの蓄積と運転・操作方法が確立できた。①リン濃縮液の好気処理の必要性: 本実験では循環 DHS リアクターを濃縮液槽内に設置することで対応した。濃縮液中の固形成分の除去に効果があった他、残存有機物の除去により、PAOs の生育を阻害する硫酸還元反応とその原因細菌である硫酸還元菌の増殖を低減できたと考えられる。②嫌気運転開始時における投入有機物の攪拌工程の追加: リアクター高さ方向に生じていた有機物濃度勾配が解消され、これまで設定有機物濃度よりも希薄であったリアクター上～中部におけるリン接収・放出性能が改善されたと考えられる。③十分な嫌気運転時間の確保のための生物膜の剥離除去: 嫌気運転時のプロファイル結果では、COD 濃度の減少に比べて DO 濃度の減少速度が極めて緩慢であることも示された (図 16)。このような現象は、濃縮液で満たされたリアクター内部で酸素供給が行われる以外に起こりえないことから、生物量が増えて肥大化したリアクター内の担体に空気がトラップされている可能性が強く示唆された。この対策としては、嫌気準備運転時にも空気供給を続けて、バブリングにより肥大化した生物膜を剥離させることを考えている。適切な生物膜厚さを保つことがリン除去・回収性能の維持・向上には必須であるといえる。

また、室内実験結果より、リン濃度の大小によって優占する PAOs の種類が異なることがわかった。それぞれの PAOs の特性を明らかにできれば、希薄なリン含有排水 ($< 1\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$) からリン濃縮を経て ($< 100\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$)、その濃縮液を更にリン濃縮させる二段階リン濃縮プロセスにより、計算上は $700\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上の超高濃度リン含有水を得ることも可能であることが明らかになった。

2.2.6 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) Megm, 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.

年度毎の特許、論文、外部発表等（件数）

広島大学

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表 （プレス発表 等）
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H20FY	1件			2件		12件
H21FY					1件	7件
H22FY				1件		10件
H23FY				1件		5件

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

2.3 バイオフィーム工学による微生物デザイン化

(北海道大学大学院地球環境科学研究院)

2-3-1 研究開発目的

微生物の自然存在形態ともいえるバイオフィームの形成という視点から複合微生物系における微生物間相互作用を理解し、さらにこれを制御すること（バイオフィーム工学）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を開発する（森川正章，2008；Morikawa，2006）。ここで、バイオフィームとは固体表面あるいは界面に付着した微生物細胞が形成する高次構造体を指す。バイオフィーム内では細胞間や表層に蓄積するマトリクスと呼ばれる細胞外高分子が糊やシェルターの役割を果たし、細胞の快適な環境を守っている（Watnick & Kolter，2000；図1）。

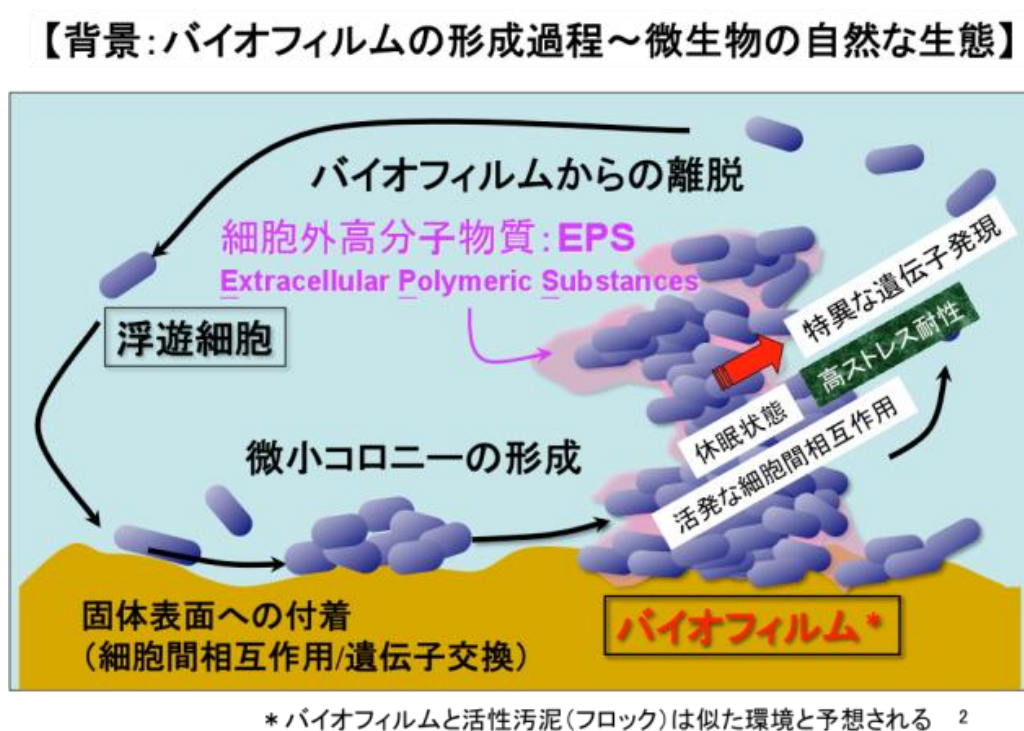


図 1

項目1．バイオフィーム工学による活性汚泥法の効率化・安定化を目指す。具体的には硝化槽の性能の鍵となるアンモニア酸化細菌についてその特性をバイオフィーム形成の視点から理解し、バイオフィーム形成による安定化を目指す。

また次世代の水処理システムとして期待される嫌氣的アンモニア酸化法において中心的な役割を果たす Anammox 菌についてもバイオフィーム工学的手法を適用しその特性の理解

と安定化を目指す。

項目 2. 偏在する環境汚染物質として炭化水素類を取り上げ、その分解細菌群の汚染現場への安定的な導入法の技術基盤をバイオフィルム工学の視点から開発する。

項目 3. 植物との共生関係を利用した炭化水素分解細菌群のデザイン化および現場への導入法を開発する。ここでいう「デザイン化」とは「複合微生物系を単純化してその要素を理解し、合理的に部分再構築して生物反応の効率化をはかる技術」を指す。

2-3-2 研究開発方針

研究開発は概ね以下の基本方針に沿って推進した。

1) バイオフィルム形成条件検討

窒素処理および炭化水素類の分解を担う主要細菌について、細菌自身及びそれを取りまく細菌群との細胞間相互作用について調べると同時に、バイオフィルム形成条件を検討する。

2) 単独バイオフィルムの性能検討

窒素処理および炭化水素類の分解に関与する細菌が形成する単独バイオフィルムの性能を浮遊細胞と比較し、バイオフィルムの優位性を検証する。

3) 汚泥中の微生物の単離

汚泥からさまざまな条件で構成微生物を単離する。単離した微生物と窒素処理に関与する細菌の混合バイオフィルムを形成させ、排他的あるいは協調的な微生物間の相互作用をもつものを選抜する。そこで得られるより安定な複合バイオフィルムについて環境耐性を評価する。

4) 微生物間相互作用の探索

3) で選抜した微生物の組み合わせ及び炭化水素類分解細菌による複合バイオフィルム形成において機能する活性シグナル分子を特定し、その構造を決定する。

2-3-3 研究開発の詳細内容及び成果

項目 1-1 硝化槽におけるアンモニア酸化細菌群のデザイン化:バイオフィルム工学による活性促進技術の開発 -活性汚泥疑似環境における活性化機構-

項目 1 では、活性汚泥法の効率化・安定化を目指した。具体的には硝化槽の性能の鍵となる好氣的アンモニア酸化細菌について、バイオフィルム化による影響ならびに活性汚泥中で共存する従属栄養細菌群による影響を明らかにし、これらを最適化することによって硝化槽微生物群をデザイン化し、硝化槽のアンモニア処理効率化および安定化を目指した。

バイオフィームと活性汚泥フロックは微生物細胞が高密度に凝集している点において類似した環境といえる。そこで先ず、複合微生物凝集体である活性汚泥による窒素処理で中心的な役割を担うアンモニア酸化細菌の本質をバイオフィーム形成の視点から理解した。具体的には、アンモニア酸化細菌標準株 (*Nitrosomonas europaea* IFO14298 : 以下 AOB) の純粋培養系を使ってバイオフィームを形成させ、そのアンモニア酸化活性を浮遊細胞と比較した。種々の材質固体を試した結果、ケイ酸・石英ガラスやポリプロピレンあるいはポリスチレンなどのプラスチック樹脂類に AOB は付着しないこと、ケイ酸カルシウム (コンクリート) 系担体にはよく付着してバイオフィームを形成することを見出した (図 2)。

【項目 1-1: アンモニア酸化細菌群のデザイン化 1】

AOB の純粋バイオフィーム化に成功し、アンモニア酸化活性が 30%程度向上することを確認した

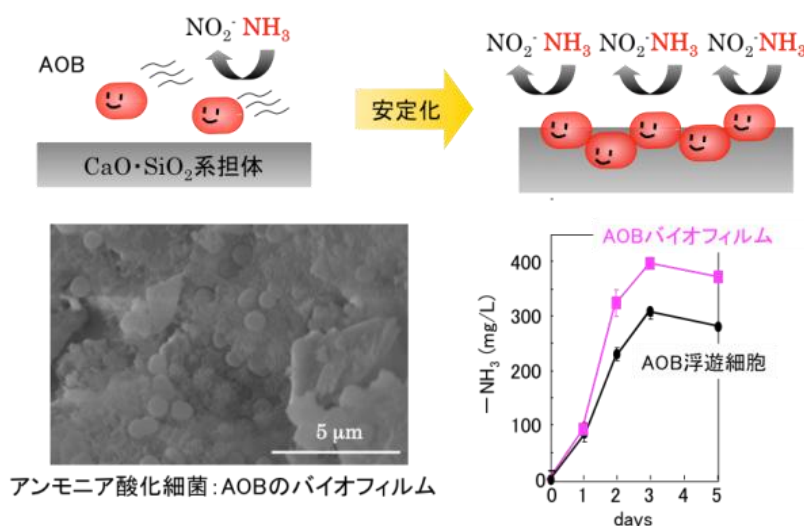


図 2

これまでに活性汚泥の包括固定あるいは結合固定の例はあるが、AOB 単独で明確なバイオフィームを形成させた例はない (Hashimoto & Furukawa, 1987; Isaka et al., 2008)。次に、AOB のバイオフィームと浮遊細胞状態のアンモニア酸化活性を比較したところ、バイオフィームの方が 2~3 倍比活性が高いことが判明した。一般にバイオフィームは休眠細胞を多く含むため、細胞活性が低下する報告例が多いなかで今回、大変興味深い結果が得られた。さらに、定量 PCR 法によってアンモニア酸化反応に関わる主要遺伝子の発現量 (mRNA 転写量) を測定したところ、初発段階のアンモニア酸化酵素 (AMO) ではなく第二段階のヒドロキシルアミン酸化還元酵素 (HAO) の遺伝子転写量がバイオフィームで約 25 倍も上昇するという全く新しい知見を得た。以上、AOB のバイオフィーム化によってアンモニア処理の 2~3 倍効率化を実現し、その機構に関わる新しい遺伝子発現調節の存在を明らかにした。

項目 1-2 硝化槽におけるアンモニア酸化細菌群のデザイン化: 従属栄養細菌群との相互作用を利用した好氣的アンモニア酸化細菌の活性促進技術の開発 -活性汚泥内の未知相互作用の解析-

本研究開発項目では、AOB と従属栄養細菌との新たな共生関係を利用した活性促進技術の基盤開発を行なった。これまで、AOB と従属栄養細菌との共生関係については、亜硝酸を介した脱窒菌との栄養共生が広く知られているのみである (Uemoto & Saiki, 1996)。すなわち、活性汚泥から約 100 種類の従属栄養細菌を単離し、それぞれ混合培養することによって AOB への影響を評価した。その結果、*Rheinheimera* 属細菌の一種である MR3 が AOB の活性を約 30% 向上させることが判明した。これまでに AOB と従属栄養細菌との共生については脱窒菌による亜硝酸除去作用が知られているが、MR3 には脱窒活性はなく、アンモニア消費活性もなかった。一方、MR3 をゲル包括固定 (日立プラントエンジニアリング社法) しても AOB の活性を促進することが判り、MR3 が活性促進因子を細胞外に分泌していることが示唆された。そこで、MR3 の培養上清を HPLC 分析したところ、これまで AOB が利用できるとされているグルタミンなどのアミノ酸類は含まないことが判った。現在、この未知ピーク成分について構造を解析中である。

一方、項目 1-1 で作製した AOB バイオフィームに MR3 や同属細菌 *R. aquimaris* JCM14331 を混合して培養したところ、アンモニア酸化活性がさらに 2~3 倍向上することが判った (図 3)。

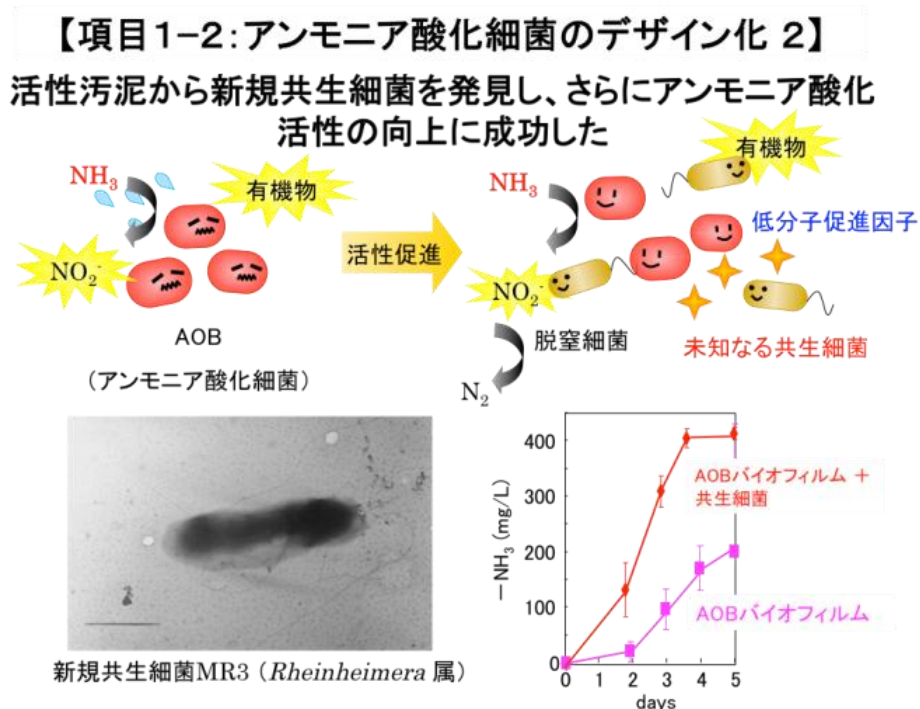


図 3

以上の結果から、AOB をバイオフィーム化し、さらに活性汚泥細菌 (*Rheinheimera* 属) を共存

させること（微生物群デザイン化）によって、アンモニア処理活性を格段に上昇させることに成功した。さらに、極めて複雑な微生物相互作用が繰り返される活性汚泥内：ブラックボックスでの AOB の生理学的特性を理解するために必要な基礎的知見を得ることができた。

項目 1-3 Anammox リアクターにおける微生物デザイン化：嫌気的アンモニア酸化細菌 (Anammox 細菌) の生理学的諸特性の解析と活性の促進 -Anammox 細菌の膜タンパク質解析-

Anammox 細菌のグラニュール化の促進とリアクター立ち上がり期間を短縮することを最終目標として、Anammox 細菌の特異な生理学的特徴であるグラニュール形成（バイオフィーム形成と類似と仮定）や窒素代謝に関する分子機構を解析した。

Anammox 細菌として *Candidatus Brocadia Sinica*（北海道大学工学研究科岡部研究室より提供）を対象とした。Anammox 細菌は細胞内にアナモキシソームと呼ばれる特殊な膜脂質で包まれた小器官を有し、窒素代謝で重要な役割を果たすことが知られている。そこで、*Ca. B. sinica* が 90% 以上優先化したグラニュールをガラスビーズで破碎し、超遠心分離により細胞の膜画分と可溶性画分を分画した。それぞれを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質解析したところ、膜画分に著量発現する 3 種類のタンパク質（P35, P45, P90）を見出した。それぞれ、ゲルから抽出して部分アミノ酸配列を決定したところ、窒素代謝で重要な酵素ヒドラジンヒドロラーゼのサブユニットであることが判った（図 4）。

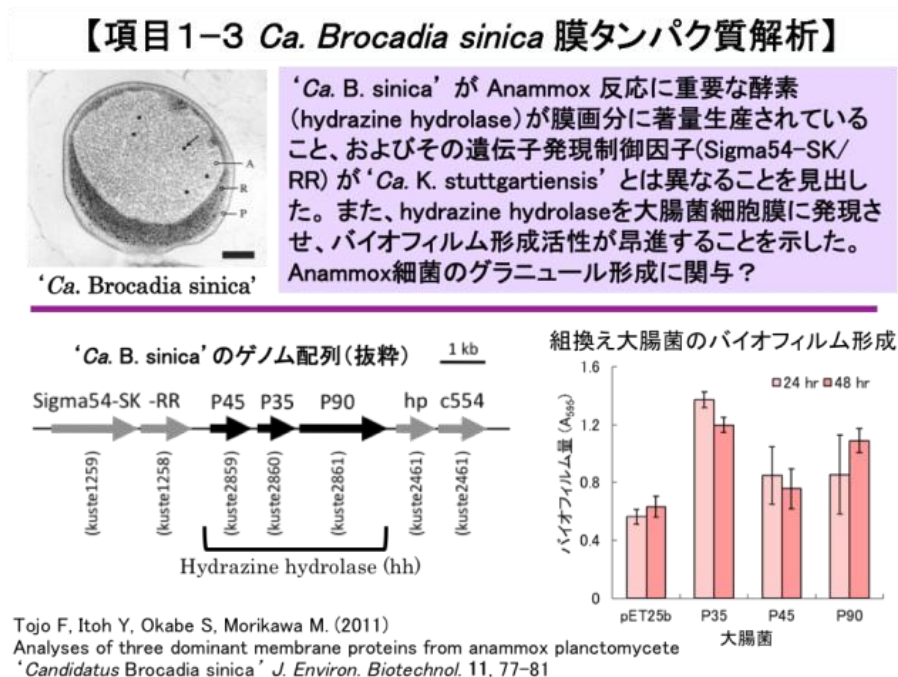


図 4

同酵素は別の Anammox 細菌 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* ではアナモキシソームの可溶性タンパク質として報告されており、本細菌とは異なる。さらに、*Ca. B. sinica* ゲノム情

報解析の結果から、これらのタンパク質遺伝子群はひとつの遺伝子クラスターを形成し、その上流には窒素飢餓に応答する Sigma-54 因子依存型の二成分制御系が存在していた。さらに興味深いことに、この二成分制御系は *Ca. K. stuttgartiensis* とは違うタイプ、すなわち *Candidatus Brocadia Sinica* に固有のものであった。次に、P35, P45, P90 の遺伝子をそれぞれ大腸菌で発現させた結果、バイオフィーム形成活性が 20~50% 上昇することが明らかとなった。これはアナモキシソームを持たない大腸菌では P35, P45, P90 が細胞質膜に局在して細胞の凝集や付着活性に影響を及ぼすことを示す結果である。これはアナモキシソーム膜タンパク質を大腸菌で発現した初めての成果である (Tojo et al., 2011)。

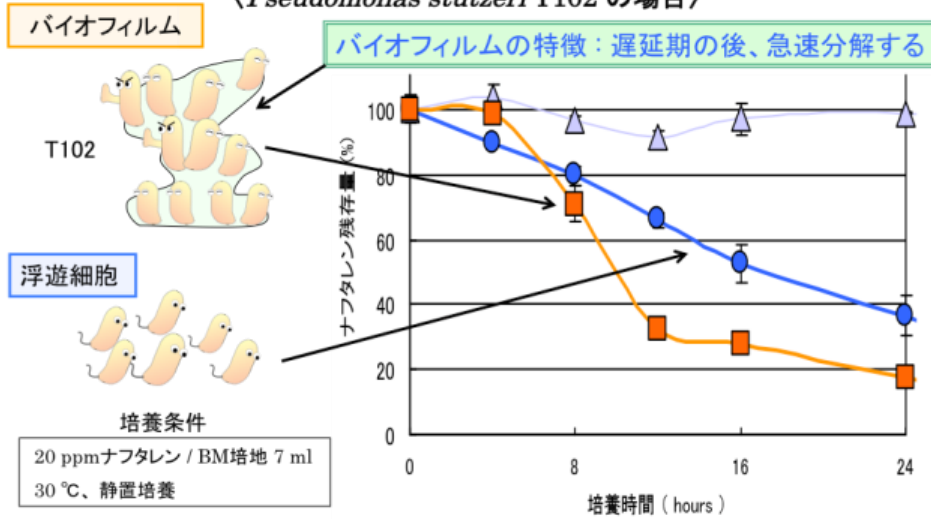
項目 2 炭化水素分解細菌のデザイン化:炭化水素化合物汚染土壌浄化技術の効率化 -炭化水素分解細菌バイオフィームの実証試験-

野外の汚染土壌現場で汚染物質分解細菌を投入して汚染浄化する際の処理効率を決定するのは細菌の活性発現と定着率である。バイオフィームの形成は環境微生物の生存戦略の一つとして知られており、バイオフィーム内の細胞の多くは休眠状態となり温度、pH、化学物質など様々なストレスや生存競争に対する抵抗性が向上することが知られている。そこで本研究開発項目では炭化水素分解細菌をあらかじめバイオフィーム化してから汚染土壌に投入することで細菌の定着率を向上させ、従来の環境修復技術よりも効率的かつ安定的な環境修復が行える可能性について検討した。

研究室所有の石油系炭化水素分解細菌 7 種についてポリプロピレンやケイ酸ガラス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ゾチオフェンなどの芳香族炭化水素類を分解する *Pseudomonas stutzeri* T102 が最も良好なバイオフィームを形成した。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。しかし、4 時間後以降は速やかな分解が見られ、ナフタレン 20 ppm の 70% を分解するのに要する時間は浮遊細胞では 28 時間かかった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 (図 5)。

【項目2:原油汚染土壌浄化細菌 T102のデザイン化】 〈バイオフィルムと浮遊細胞のナフタレン分解活性比較〉

〈*Pseudomonas stutzeri* T102 の場合〉

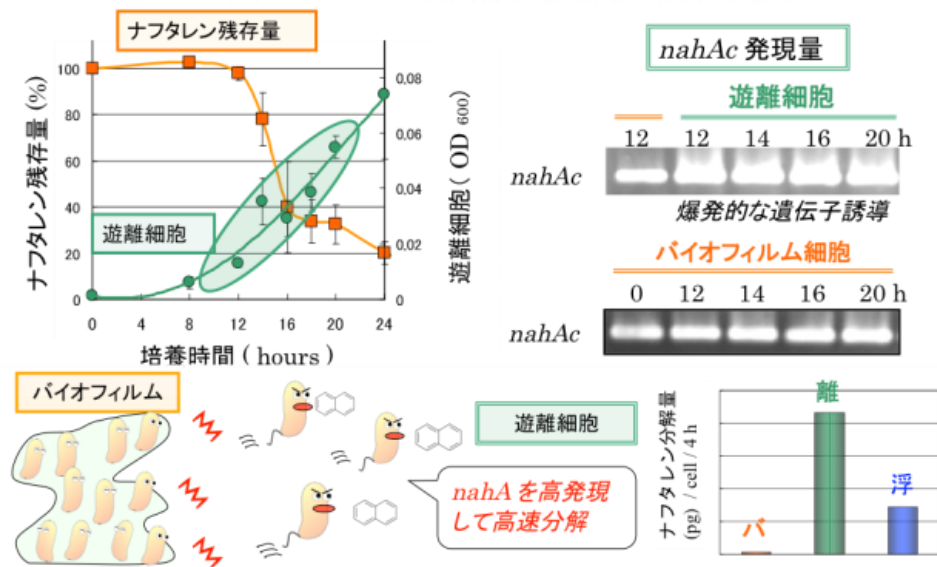


バイオフィルムと浮遊細胞では T102のナフタレン分解特性が異なる

図 5

このことから、バイオフィル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高速でナフタレンを分解できる特性を有するという興味深い特性を有することが明らかになった。そこで、その原因を探求したところ、バイオフィルムから遊離してくる細胞がナフタレン分解酵素遺伝子を爆発的に発現していることが判った (図 6)。

〈バイオフィルムと遊離細胞のナフタレン分解遺伝子比較〉



ナフタレン急速分解は、バイオフィルムから遊離した高活性細胞に由来する

図 6

さらに48時間後の生菌数（CFU: colony forming units）は浮遊細胞に比べてバイオフィルム細胞の方が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ルムの効果を検証した。北海道石狩油田跡地では現在も油井からにじみ出した原油が地表に漏出し続けている。そこで、この原油汚染土壌を採取し T102 を浮遊細胞あるいはバイオフィルム細胞状態で投入した際の定着率を比較した。まず、あらかじめ静置培養によって培養ガラス瓶内壁にバイオフィルムを形成させた。次に汚染土壌を入れ強く攪拌し、ガラス瓶内壁からバイオフィルムを剥離し土壌中に分散させた。また対照実験として振とう培養した浮遊細胞培養液を汚染土壌に添加した。この際に生菌数は同じになるよう調整した。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9週間にわたり比較した。定着細胞数は16S rRNA 遺伝子を鋳型とした PCR 増幅 DNA を DGGE (detergent density gradient gel electrophoresis) 法で分析し、SYBR green により染色された DNA バンドの濃淡をデンストグラフで定量した。その結果、バイオフィルムの方が定着性は高く、9週間後においても T102 のバンドが確認できた（図7）。

〈T102 導入実汚染土壌の菌叢解析 16SrRNA-rtPCR-DGGE〉

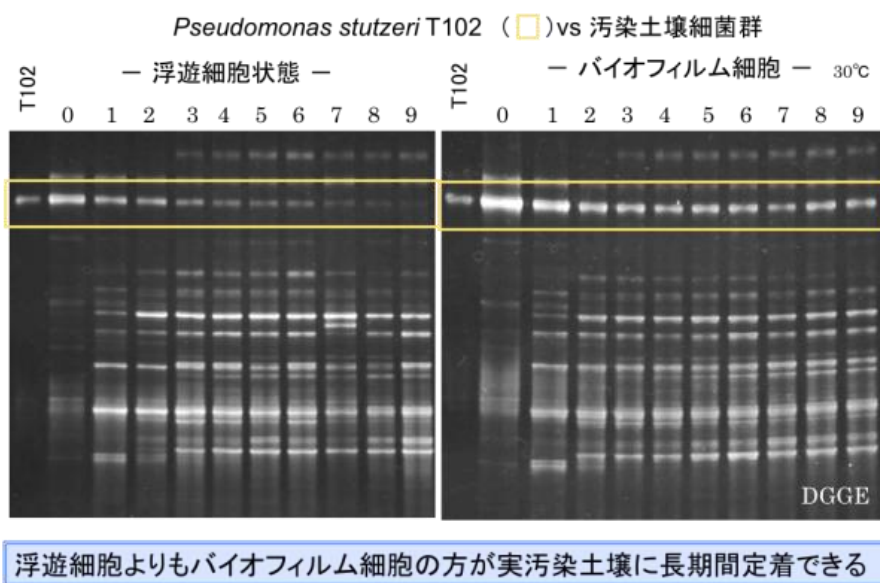
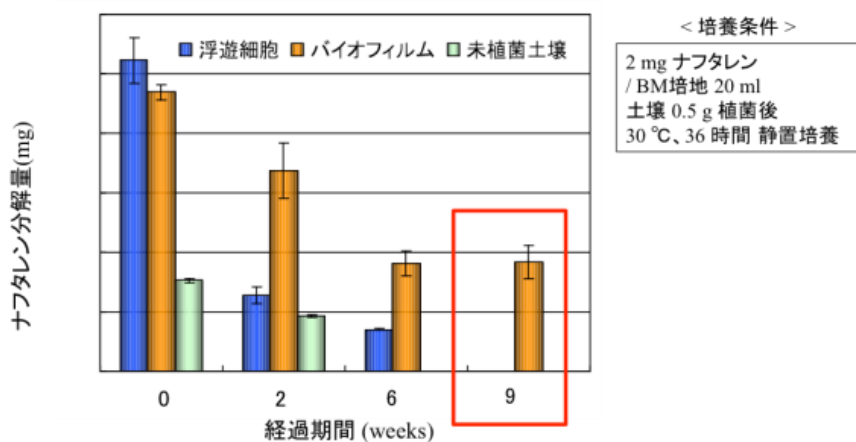


図 7

さらに T102 バイオフィルムを含む土壌は9週間後においてもナフタレン分解活性を維持していることを確認した（図8）。

〈T102を導入した実汚染土壌のナフタレン分解活性比較〉



T102 バイオフィーム保有土壌はナフタレン分解活性を長期間維持する

図 8

以上、ナフタレン分解細菌をバイオフィーム化することで分解持続性を大幅に拡大（効率化）することに成功した。

また、バイオフィームの高分解活性持続性の要因は「高い環境耐性」と「高活性細胞の放出」であった。つまり、バイオフィームは高性能な戦闘機をつぎつぎに発射する頑強な空母のような機能を果たすことを発見した (Shimada et al., 2012)。

項目 3 植物—根圏細菌群のデザイン化：炭化水素化合物汚染水浄化技術の効率化 -水生植物-根圏細菌共生作用の解明と根圏バイオフィーム工学-

微生物環境浄化技術の実施例において汚染現場での微生物定着率の低さ、分解活性の低下に加えて栄養源や外来微生物の投入による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、本研究項目では植物と微生物の協働を利用した新しいバイオレメディエーション技術の開発を目指した。植物の根の周囲を根圏と呼ぶ。根圏では植物代謝により生成される糖、アミノ酸等の有機物、お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、増殖や代謝を促進する (Badri et al., 2009)。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、浄化後に植物体と共に現場から除去することで二次汚染を回避できると考えられる。すなわち、本研究開発項目では植物と根圏細菌の共生作用を利用した根圏微生物群集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、北大植物園より採取したアオウキクサ *Lemna aoukikusa* を使用した。アオウキクサと共存する根圏微生物を、各炭化水素を含む培地で1週間集積培養した後、根表面から遊離させ寒天平板法により単離した。単離した細菌のうち、各炭化水素を単一炭素源とした培地で生育可能でコロニー形態の異なる細菌をそれぞれ109菌株（フェノール）、79菌株（ナフタレン）、41菌株（原油）取得した。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。

なかでも特に、*Pseudomonas* sp. P2 および *Acinetobacter calcoaceticus* P23 は優れたフェノール分解活性を有すると共に、約90%もの細胞がアオウキウサ根へ強く付着することを見出した（図9）。

〈除菌ウキクサへの根圏細菌再付着の様子〉

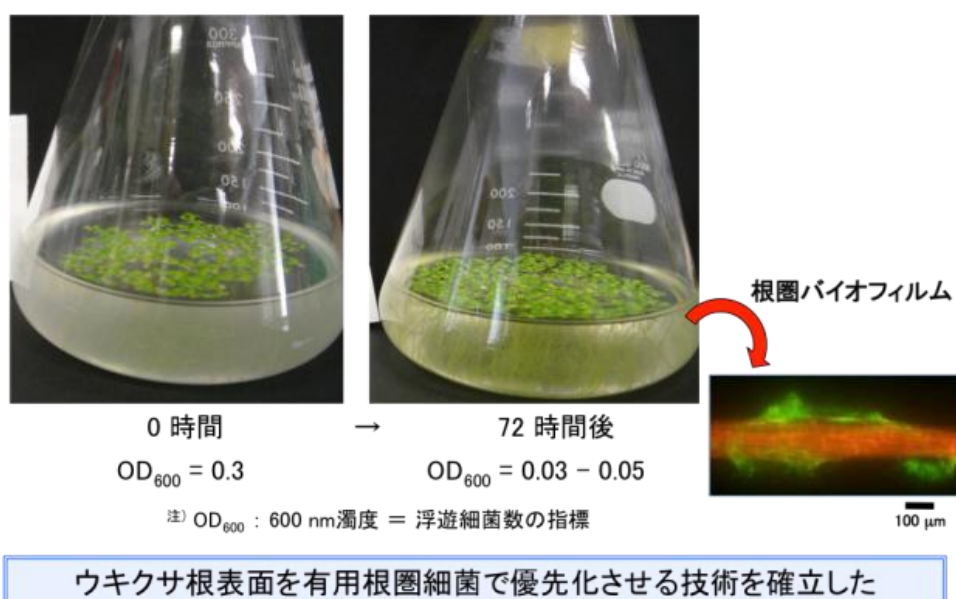


図 9

次にアオウキウサ根表面を蛍光顕微鏡で観察したところ、P2は非常に厚いバイオフィームを形成したのに対して、P23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10⁸の細菌が付着していた（図10）。

〈P2 と P23のアオウキクサ根圏バイオフィルムの違い〉

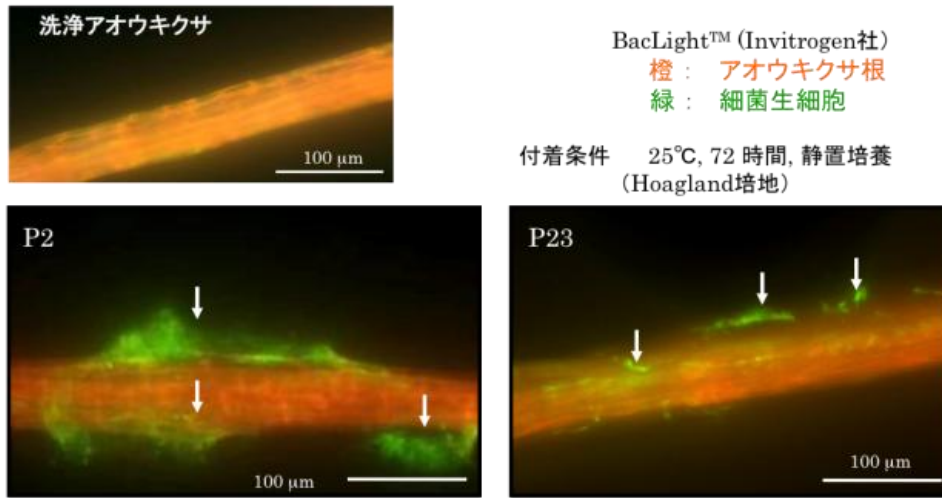


図 10

続いて、アオウキウサ根表面に形成した P23 バイオフィルムのフェノール分解特性を洗浄前のアオウキウサ（根圏細菌あり）および洗浄アオウキウサ（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、P23 付着アオウキウサのみ、フェノール分解活性は 160 時間以上持続した（図 11）。

〈P23付着アオウキクサのフェノール分解持続性〉

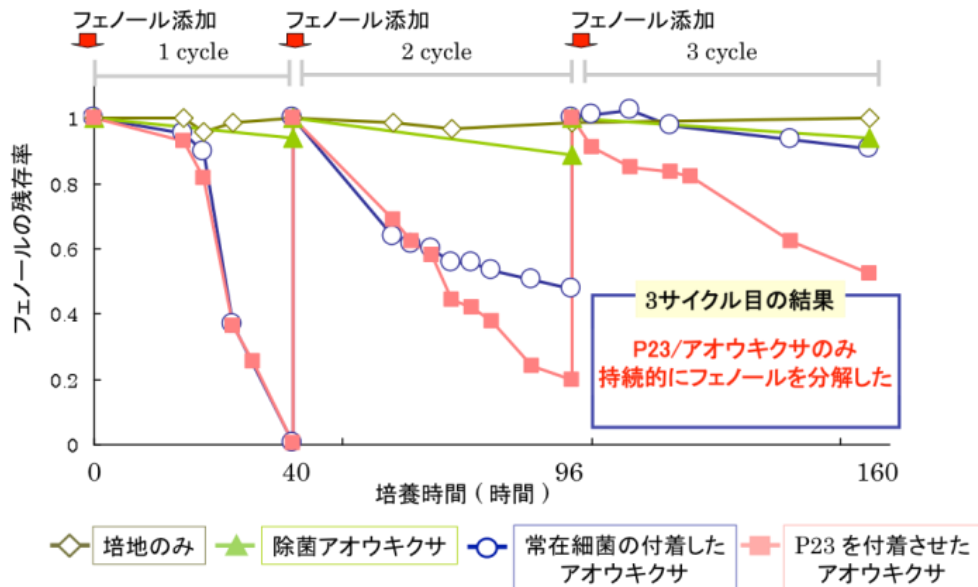


図 11

常在細菌が付着した野生ウキクサでフェノール分解活性が低下した理由は、共存する多数の根圏細菌との生存競争により淘汰されたものと思われる。

ここでさらに興味深いことに、P23 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 倍の生育速度（葉状体の数の増加）を有していることを発見した。これはアオウキウサの生育促進根圏として世界初の報告である（Yamaga et al., 2010）。

以上の成果をまとめて特許出願した（特開 2009-247279 「新規水草根圏微生物」）。

2-3-4 参考文献

Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM. (2009)

Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions.
Curr. Opin. Biotechnol. 20(6), 642-650.

Hashimoto S, Furukawa K. (1987)

Immobilization of activated sludge by PVA-boric acid method.
Biotechnol. Bioeng. 30(1), 52-59.

Isaka K, Date Y, Sumino T, Tsuneda S. (2007)

Ammonium removal performance of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier: anammox bacteria immobilized in gel carrier.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 76(6), 1457-1465.

Morikawa M. (2006)

Beneficial biofilms formation by industrial bacteria, *B. subtilis* and related species.
J. Biosci. Bioeng. 101(1), 1-8

森川正章

バイオフィルムがもたらすブレイクスルーの可能性

ブッカーズ編「バイオフィルムの基礎と制御」 pp 389-399 (2008) (エヌティーエス)

Shimada K, Itoh Y, Washio K, Morikawa M. (2012)

Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms.
Chemosphere 87(3), 226-233

Tojo F, Itoh Y, Okabe S, Morikawa M. (2011)

Analyses of three dominant membrane proteins from anammox planctomycete Candidatus 'Brocadia sinica.'
J. Environ. Biotechnol. 11(1-2), 77-81

Uemoto H, Saiki H.

Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*.

Appl. Environ. Microbiol. 1996 Nov;62(11):4224-8.

Watnick P, Kolter R. (2000)

Biofilm, city of microbes.

J. Bacteriol. 182(10), 2675-2679.

Yamaga F, Washio K, Morikawa M. (2010)

Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*.

Environ. Sci. Technol. 44(16), 6470-6474

(年度ごとの特許、論文、外部発表等は添付書類を参照のこと)

IV-3 実用化の見通し

項目3について、以下の2つの可能性が考えられる。

ケース1：省エネルギー型高効率栄養塩除去システム

従来の嫌気好気の二槽式活性汚泥法では1立米あたりの電気などのエネルギー消費量は約800ワット時であるが、その後段処理の50%相当分を項目3で開発した植物-根圏細菌群デザイン化システム（新植生浄化ユニット）で置き換えた場合、同程度の水処理に要するエネルギーは300ワット時程度まで削減できると試算できる。さらに余剰植物体からのバイオエタノール生産で生成されるエネルギーはおよそ60ワット時と見積もる事ができ、これを併せると極めて経済性の高い水処理法が提供できるものと考えられる。ただし、その実現までには、新植生浄化ユニットの野外実証試験に加えて、植生浄化ユニットの構築および最適運転条件の策定あるいは既存排水処理施設の改造などが必要である。

ケース2：二次処理水の水質安定化

近年、ノニルフェノールやビスフェノールなどの内分泌攪乱物質やさまざまな難分解性化合物（POPs）が工場廃水に混入するリスクが増えている。すなわち、今後二次処理が必要な廃水は増えることが予想されその処理の必要性は高まるであろう。現在はオゾン処理などコストの嵩む方法が高度処理技術として用いられているが、項目3をさらに発展させてPOPsに対応できる新植生浄化ユニットが開発できれば、省エネ型の高度処理技術が提供できる可能性がある。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

北海道大学地球環境科学研究所

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表 (プレス発表 等)	受賞実績
	国内	外国	PCT※出 願	査読付 き	その他		
平成 19 年度	0 件	0 件	0 件	1 件	2 件	5 件	0 件
平成 20 年度	1 件	0 件	0 件	5 件	3 件	15 件	0 件
平成 21 年度	0 件	0 件	0 件	4 件	1 件	13 件	0 件
平成 22 年度	0 件	0 件	0 件	4 件	0 件	15 件	1 件
平成 23 年度	0 件	0 件	0 件	4 件	1 件	23 件	0 件

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)