

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開発
有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発
平成19年度～平成23年度(公開版)



平成24年4月19日

委託先(株)日立プラントテクノロジー
再委託先中央大学

事業原簿 Ⅲ-2-1

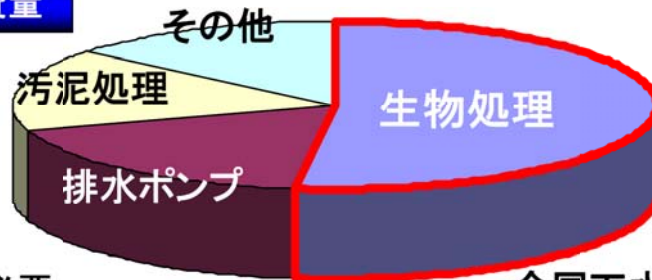
1/37

好気

開発背景(H19-21年度)

公開

処理場での電力消費量

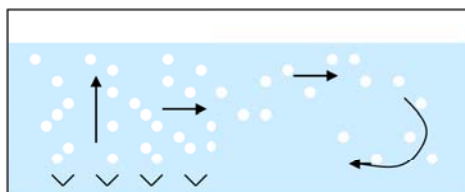


曝気動力の低減が必要

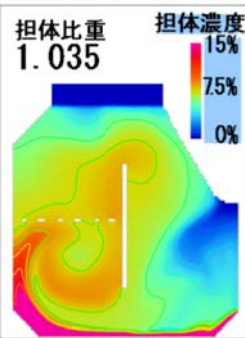
全国下水処理場での
電力総消費量 47.5億kwh/年

従来の曝気量低減技術開発

散気装置などの最適配置の解析
酸素溶解効率の向上
気泡上昇速度の低減→KLaアップ



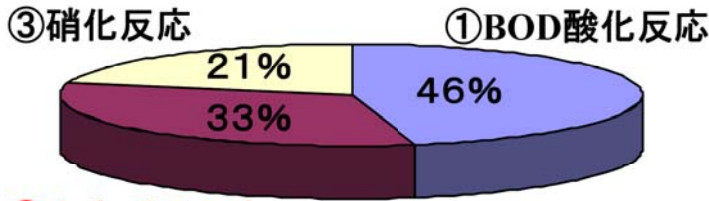
水、気泡、担体の3相流動解析



事業原簿 Ⅲ-2-1

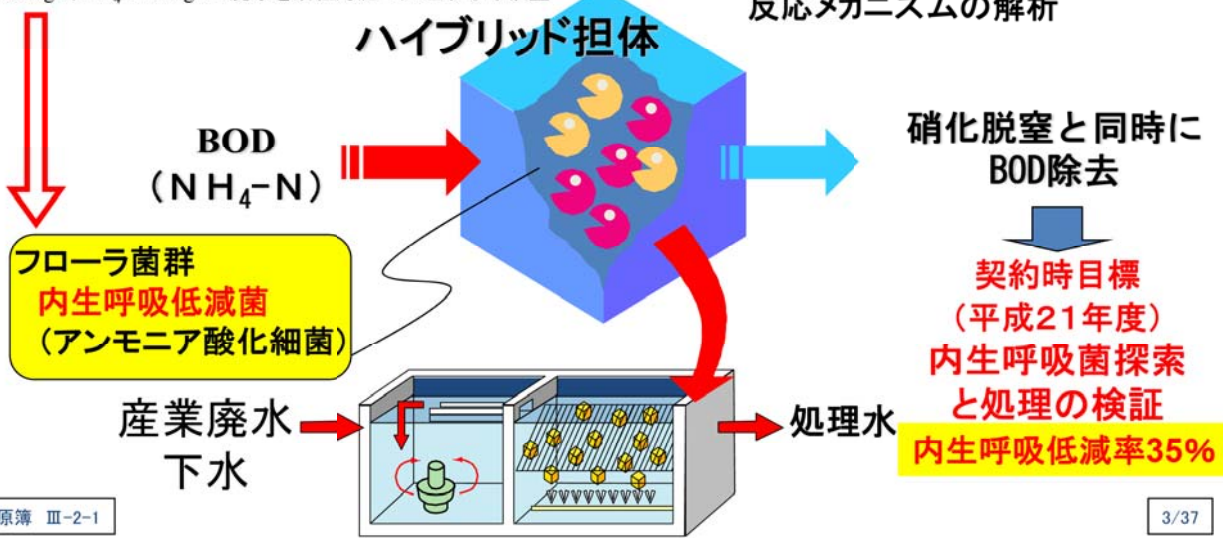
2/37

活性汚泥の呼吸量(必要酸素量)

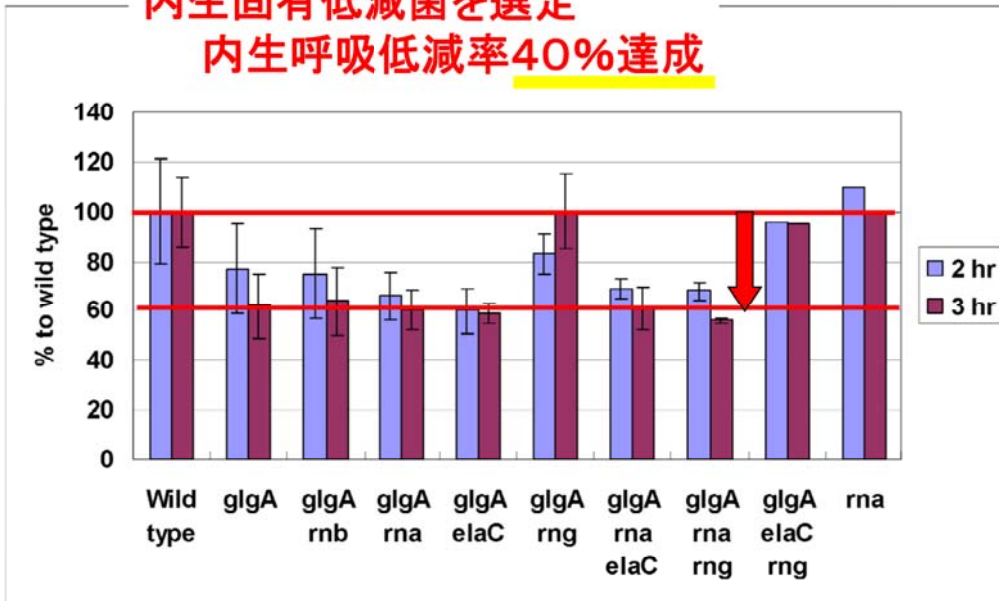


② 内生呼吸反応

BOD200mg/l、NH₄-N30mg/lの廃水を活性汚泥で処理する呼吸量



内生固有低減菌を選定 内生呼吸低減率40%達成



glgA: グリコーゲン合成欠損

rnb, rna, elaC, rng: それぞれ異なるRnasesが欠損

遺伝子組換え菌(グリコーゲン合成欠損)では内生呼吸が低減されることを確認 → 自然界から内生呼吸低減菌は得られるか？

活性汚泥構成菌の内生呼吸を解析

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)

- 一般排水処理施設二箇所より活性汚泥を採集、従属栄養細菌を分離。
- 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。
- 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°Cで培養。
- 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。
- 16S rRNA遺伝子部分配列決定。
- 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。33株を保存。(HSについては類似のもの6株を保存。)
- 炭素源の資化性および資化関連酵素活性を調査。
- 内生・外生呼吸率を測定。

分離した細菌の外生呼吸(r_1)と内生呼吸(r_2)

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

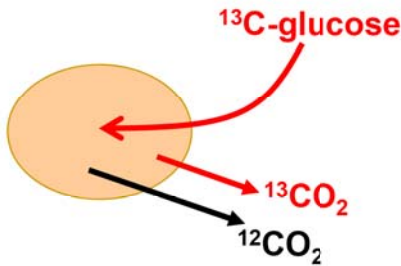
<以上の実験での定義>

内生呼吸速度＝基質が存在しない時の呼吸速度

外生呼吸速度＝基質が存在する時の呼吸速度－内生呼吸速度

しかし、上記の方法では、基質の有無に関わらず内生呼吸速度が一定と仮定。よって、基質が存在する時の内生呼吸速度を以下の方法で測定。

内生呼吸と外生呼吸の比



	r_1/r_2	
	by oxygen electrode	by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
<i>Escherichia coli</i> K-12	40.3	7.4
<i>Enterobacter</i> sp. strain B5	26.4	13.2
<i>Bacillus</i> sp. strain A4	2.5	0.5

傾向は同じだが、値は微妙に異なる。

酸素制限条件でのグルコースの分解

酸素消費効率＝基質分解に用いられた酸素量／全酸素消費量

	Initial oxygen concentration (μM)		
	220	320	420
<i>Escherichia coli</i> K-12	0.89	0.89	0.89
<i>Enterobacter</i> sp. strain B5	0.63	0.68	0.67
<i>Bacillus</i> sp. strain A4	0.072	0.089	0.138

内生呼吸低減菌は、酸素が制限された条件下で、基質分解に有利であることが実験的に証明された。

APIを用いた資化性検定

Substrate	<i>Bacillus subtilis</i> A1	<i>Bacillus cereus</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
α -methyl-D-mannoside	0	0	0	0	0
α -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
Cellobiose	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
β -gentiobiose	0	0	0	1	0.5
D-turanose	0	0	0	0.5	0
Score	14.5	8.5	2	20.5	5

事業原簿 Ⅲ-2-1

0 : 資化せず、0.5 : 弱い資化、1 : 資化

9/37

資化性ベスト8

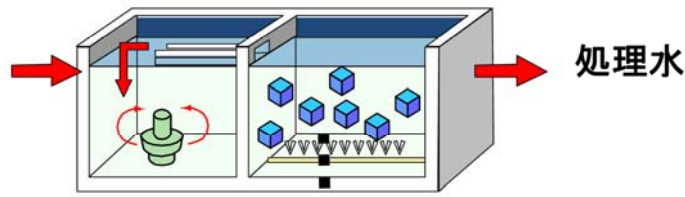
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E10	38.5
<i>Enterobacter</i> sp. strain B5	37
<i>Pantoea agglomerans</i> strain A5	33.5
<i>Bacillus subtilis</i> strain A10	25.5
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E1	23.5
<i>Escherichia coli</i> K-12	23
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E2	21
<i>Arthrobacter protophormiae</i> strain B4	20

事業原簿 Ⅲ-2-1

10/37

課題

BOD、N、P
産業廃水
下水

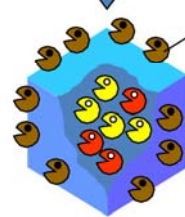


微生物群デザイン化担体
目的: 酸素要求量の低減化

(内生呼吸低減菌
など)

酸素要求量の高い
雑多な微生物

付着・増殖



担体表面への目的外微生物の
コンタミネーション

→ 酸素要求量の増加

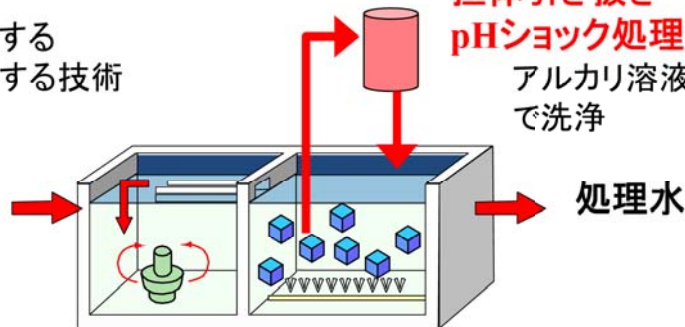
コンタミ防止システムが必要

対策

pHショック法:

流入廃水等から混入する
雑多なコンタミ菌を排除する技術

BOD、N、P
産業廃水
下水

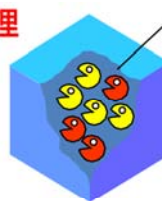


担体引き抜き
pHショック処理装置
アルカリ溶液(pH12~14)
で洗浄

担体表面への目的外
微生物のコンタミ



pHショック処理



内生呼吸低減菌

pHショック処理(pH13, 1時間)後の再増殖能を評価

内生呼吸低減菌(単離株)

Stenotrophomonas rhizophila E1株

Arthrobacter sp. B4株

Achromobacter sp. E7株

アルカリ処理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



図 再増殖した*Arthrobacter* sp. B4株

実廃水処理での内生呼吸低減菌の保持が可能

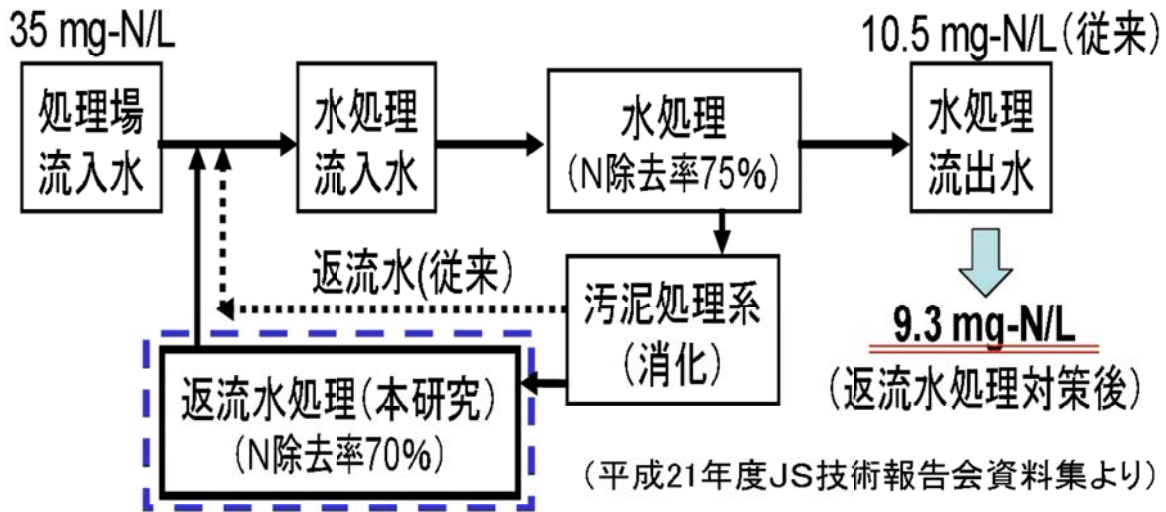
中間目標(基本計画の値)の達成度

1000m³/日、BOD200mg/L、NH₄-N30mg/Lでの必要酸素量で試算

	プロセス	曝気量	開発課題
従来技術 活性汚泥法		100	—
NEDO 新技術 中間成果		80	—
NEDO 新技術 中間成果		74	低濃度アンモニアでの亜硝酸型維持 実装置化

処理対象

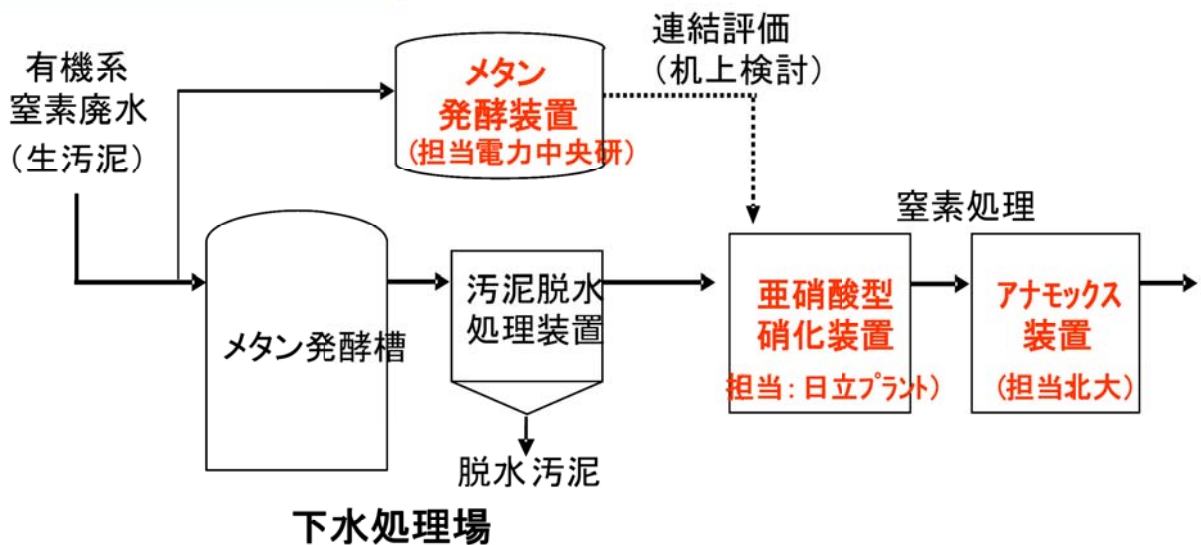
下水処理水の窒素を約10%低減



返流水(汚泥脱水ろ液)処理による負荷削減効果の試算例

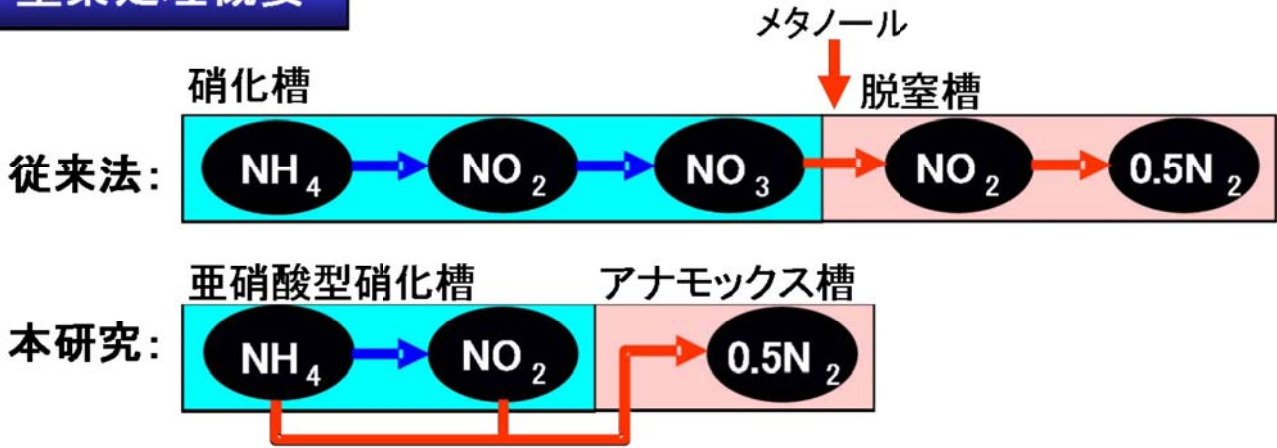
目標値: 従来法(硝化・脱窒)に比べ消費エネルギー量を1/3以下とする

実証プラントの概要



有機性窒素廃水処理の3研究機関共同での実証評価体制

窒素処理概要

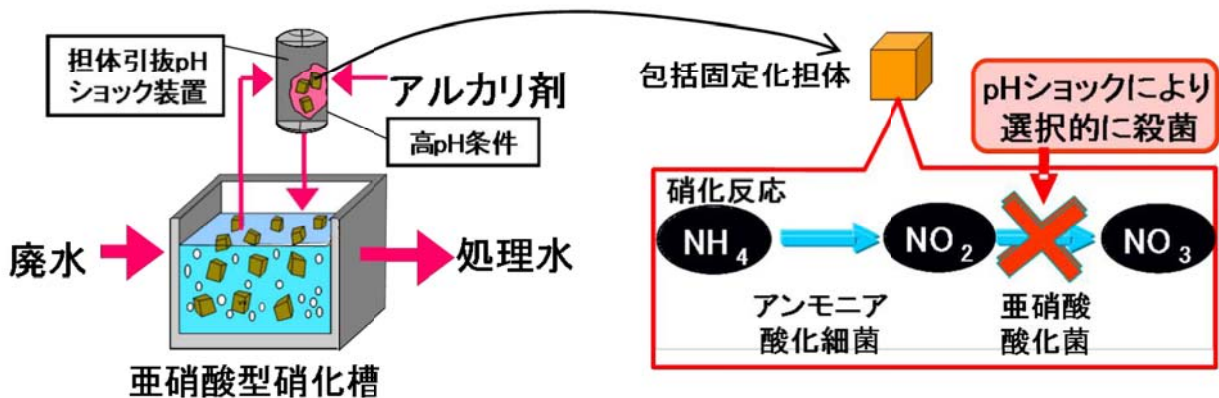


理論値

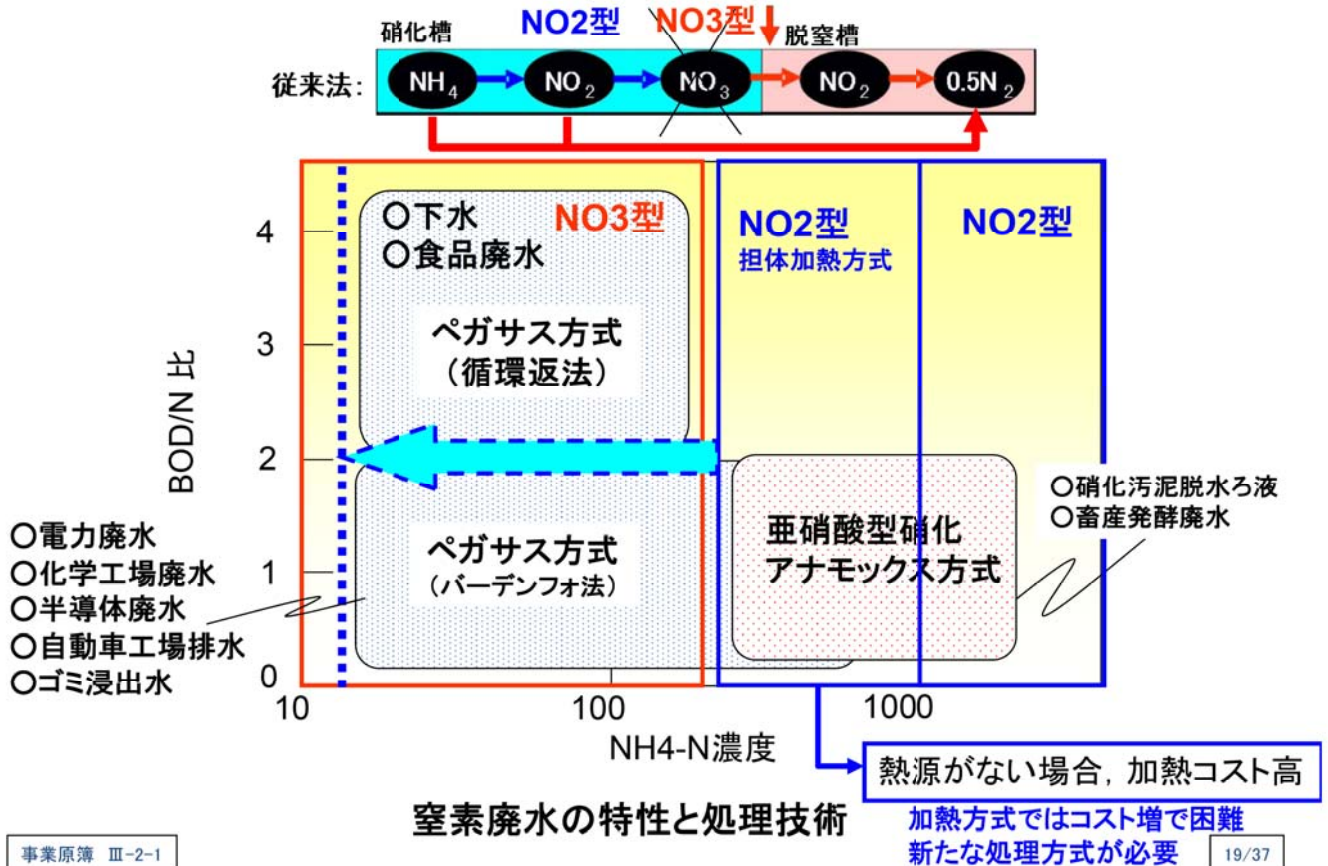
曝気量 : 55%削減
 メタノール : 86%削減
 汚泥発生 : 86%削減

pHショック法: アルカリ剤による有用微生物のスクリーニング技術

亜硝酸型硝化の原理 (弊社担当部分)



pHショック処理により特定菌だけを担体内に保持する方式で
 亜硝酸型硝化の安定処理を行う



窒素廃水の特性と処理技術

熱源がない場合, 加熱コスト高
加熱方式ではコスト増で困難
新たな処理方式が必要

1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

実廃水を対象とした亜硝酸型硝化の長期安定性評価
アルカリ剤の担体物性への長期影響評価

2) 一体処理試験による実証運転

アナモックス装置 (北大テーマ) と連結させ一体処理型廃水処理
後段への供給水となる亜硝酸型硝化処理水の窒素比率 (NH₄/NO₂) の安定性評価

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析

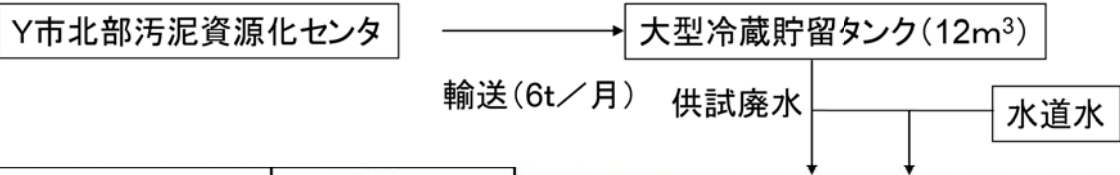
包括固定化担体中の微生物コミュニティ・メンバーの解析

4) 亜酸化窒素 (N₂O) 排出の解析

高濃度 NO₂ が蓄積する亜硝酸型硝化槽での温室効果ガス (N₂O) の調査解析

研究場所: 1), 2) 日立プラントテクノロジー / 3), 4) 中央大学

対象廃水：硝化汚泥脱水ろ液



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



好気 公開 検討結果

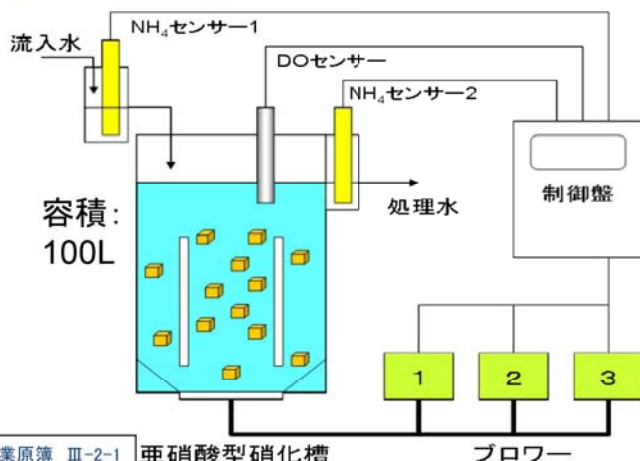
1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

実験条件

実験系	NH ₄ -N濃度 (mg/L)	硝化率制御 (57%)	水温(°C)
原液処理系	1,000	有り	30
希釈液処理系	200	無し	20

(pH7.5制御)

実験装置

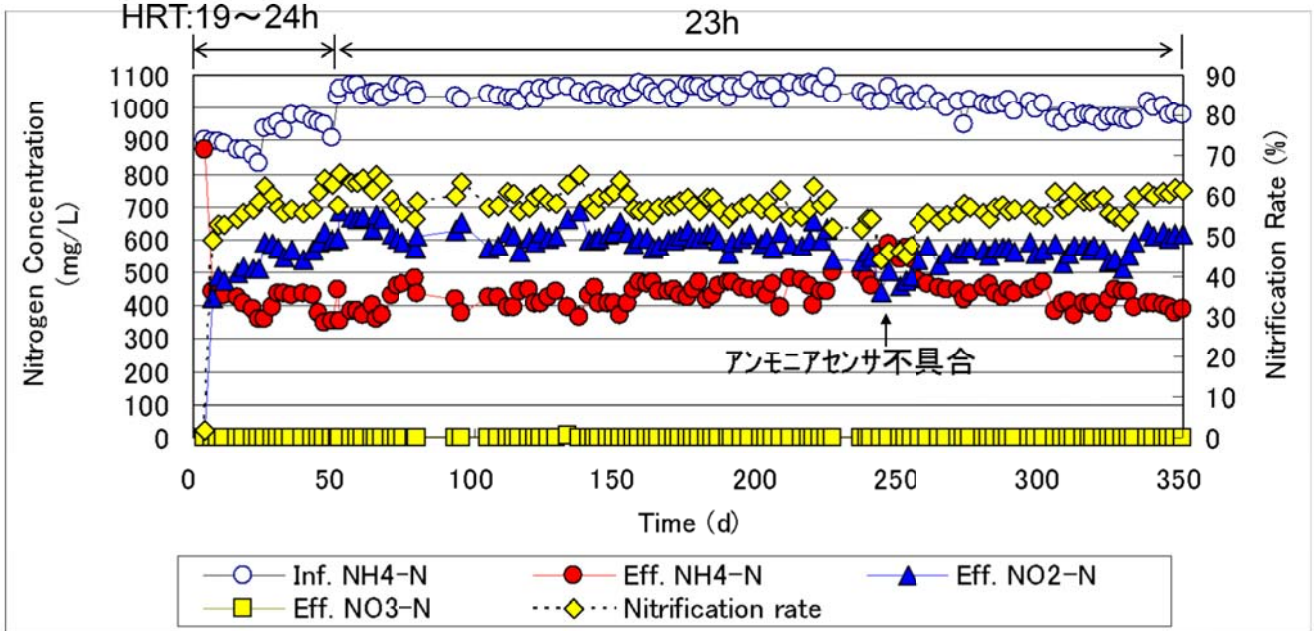


$$\text{硝化率} = \left(1 - \frac{\text{処理水NH}_4\text{-N}}{\text{流入水NH}_4\text{-N}} \right) \times 100$$

硝化率	DO
< 56 %	4.0 mg/L
56 % - 57 %	2.0 mg/L
57% <	1.0 mg/L

1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

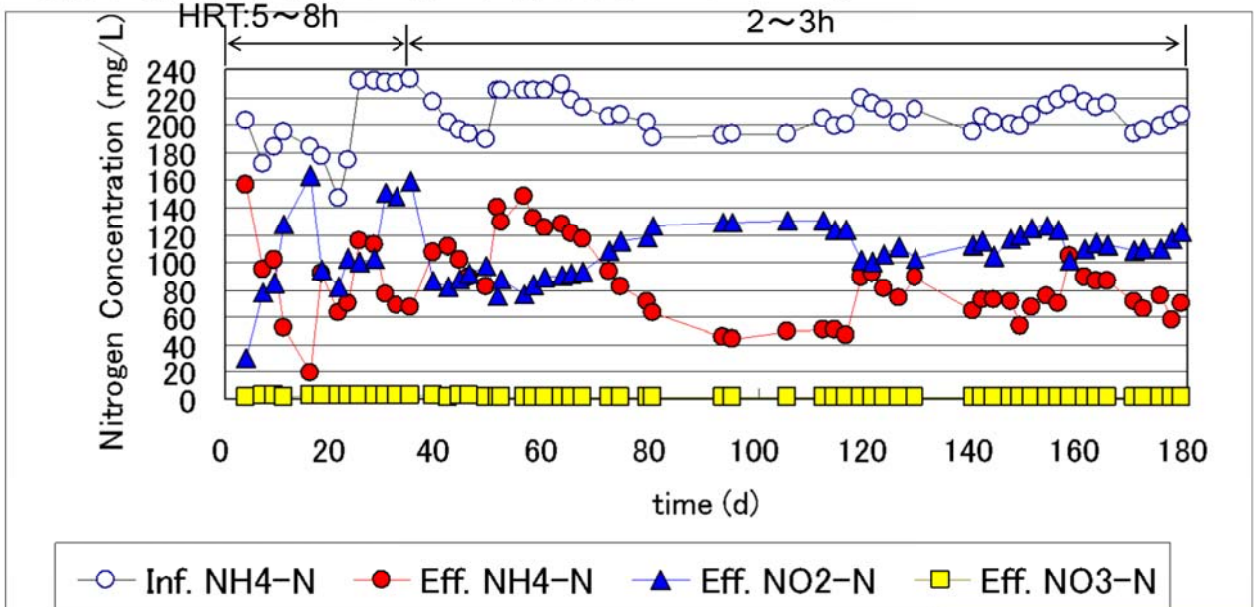
硝化率制御あり、水温30°C、pHショックなし



pHショック無しで、350日間安定した亜硝酸型硝化と硝化率を維持

1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

硝化率制御なし、水温20°C、pHショックなし DO >4mg/L



一般にNO3生成抑制には高い遊離NH3濃度が必要

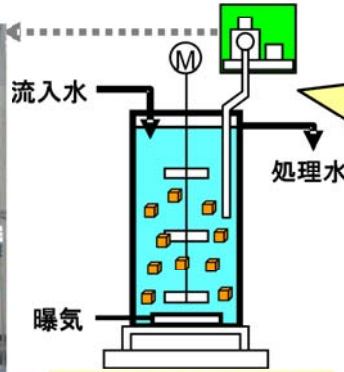
槽内遊離NH3-N 0.2~2mg/Lときわめて低い値

NO3生成抑制を維持

1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

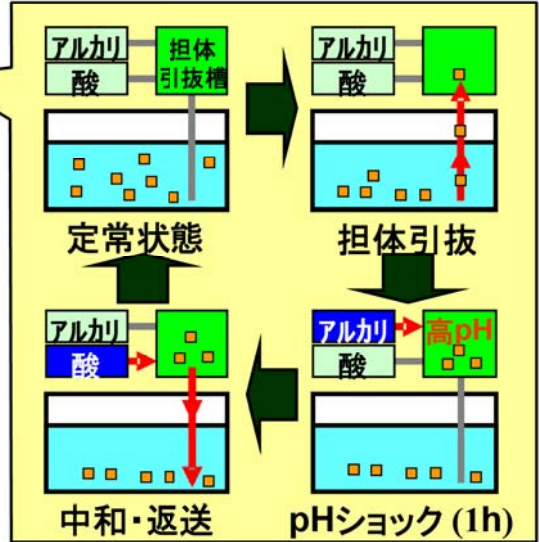
低濃度NH4廃水での評価

pHショック法(担体引抜き方式)による亜硝酸型硝化



担体引抜きpHショック処理装置 亜硝酸型硝化槽 [100 L]

条件	
担体引抜き量	: 0.2L/回
担体引抜き回数	: 1 回/日
pH条件	: pH 13、1時間

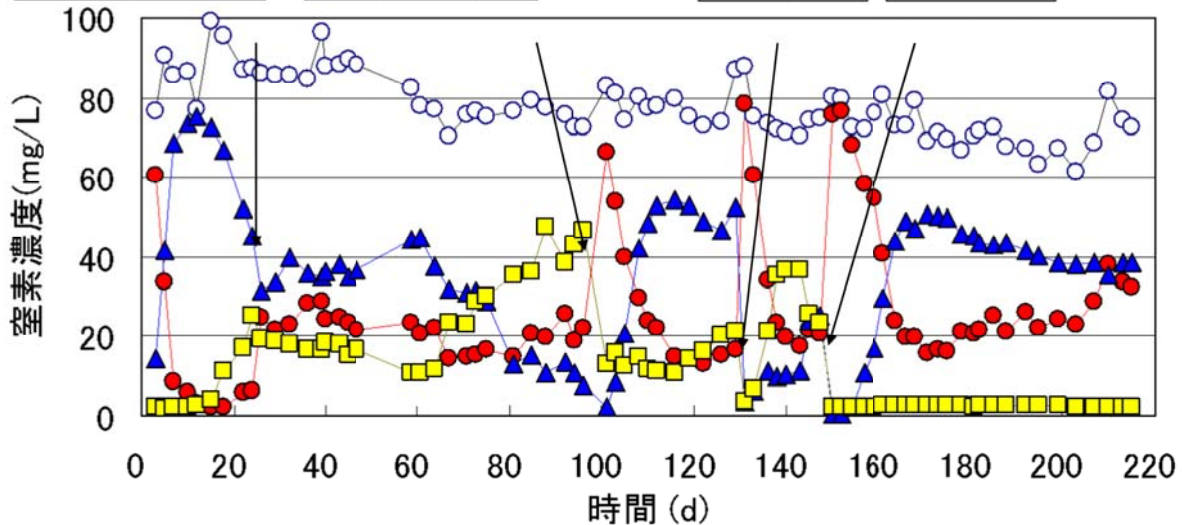


担体引抜きpHショック処理フロー

1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

硝化率制御なし、水温15-20°C、pHショックなし LDO >4mg/L

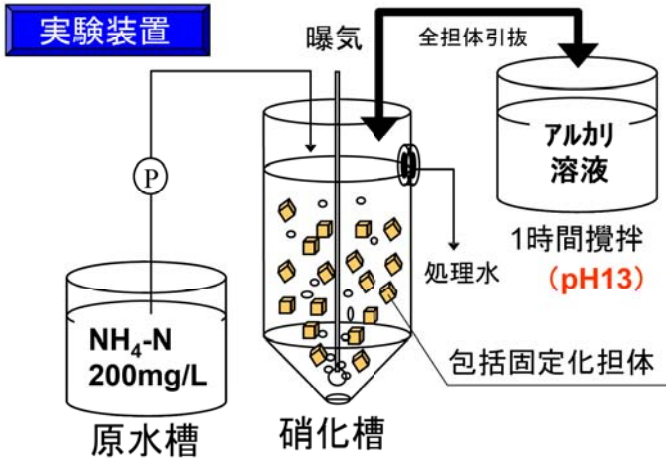
担体引抜きpHショック開始 全担体pHショック(pH10) 全担体(pH12) 全担体(pH13)



○ Inf. NH4-N ● Eff. NH4-N ▲ Eff. NO2-N ■ Eff. NO3-N

低濃度NH4廃水であっても、亜硝酸型硝化が可能であることを確認

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析



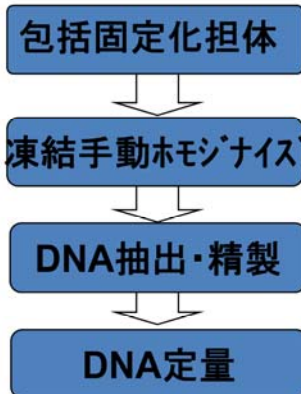
供試廃水

成分	濃度 (mg/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	100~250 as N
NaHCO ₃	2.3
Na ₂ HPO ₄ /12H ₂ O	0.23
NaCl	0.10
KCl	0.048
CaCl ₂ /2H ₂ O	0.048
MgSO ₄ /7H ₂ O	0.17

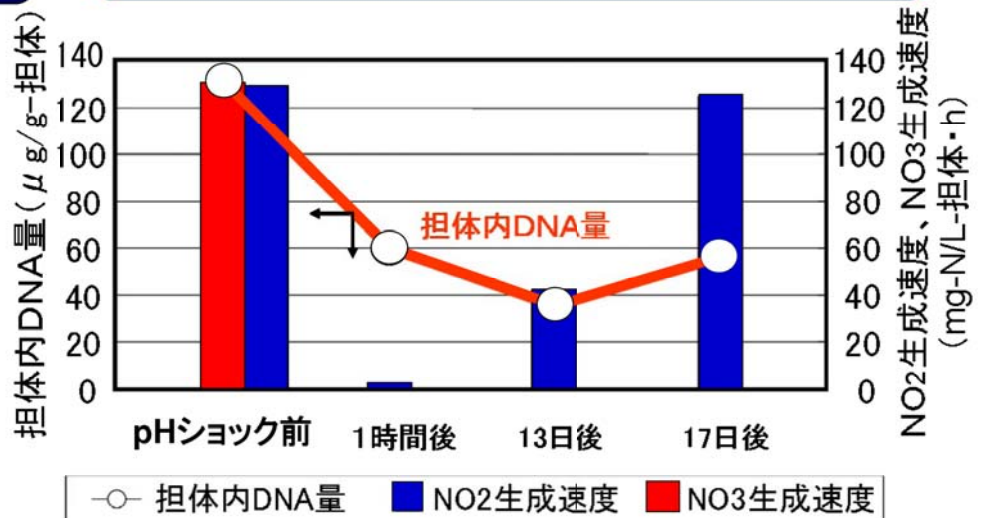
水温18°C, HRT 7.5 h, pH 8

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析

担体内DNA量の比較



合成排水処理の担体を対象とし、pHショック処理前後での担体内菌相解析を行った



担体内DNA量が半減してもpHショック前後でのNO₂生成速度は同等だった

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析

対象：
合成排水処理担体

DNAクローニング
<細菌16SrDNA>

包括固定化担体

凍結手動ホモジナイズ

DNA抽出・精製

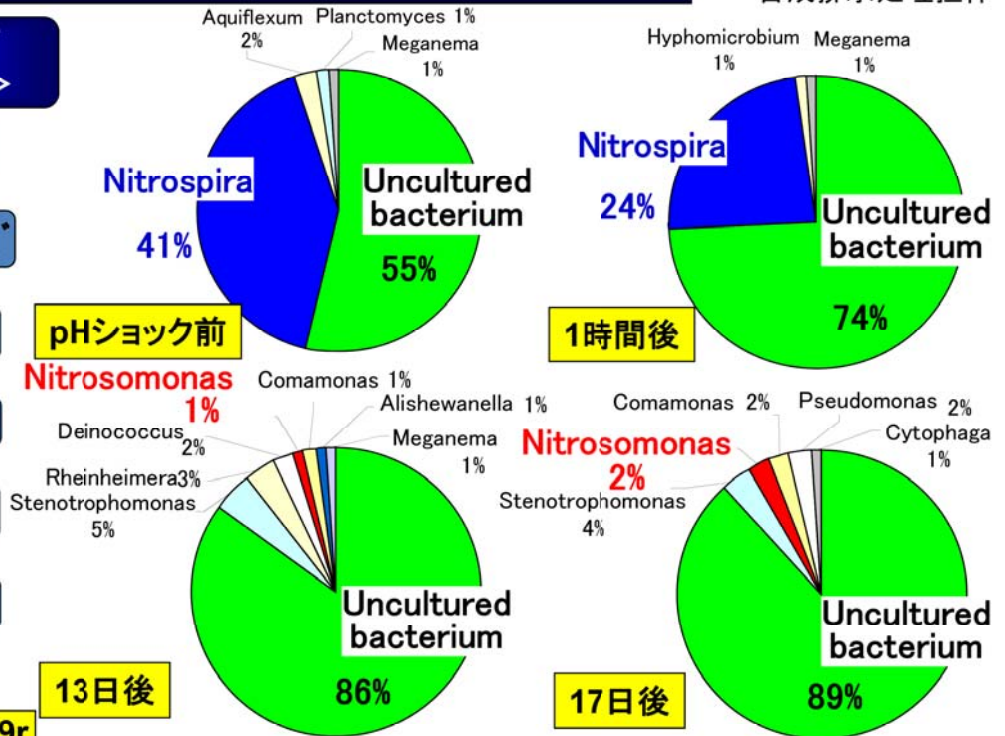
DNA定量

PCR

DNAクローニング

使用プライマー：

Bac8f & Univ529r



NOB (Nitrospira)が減少→亜硝酸生成が抑制

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析

対象：
合成排水処理担体

CTOプライマーによって検出されたAOBクローン数

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

前：pHショック直前
後：pHショック後35日目

対象：合成排水処理担体

pHショックで残存する殆どのAOBは*Nitrosomonas europaea*近縁種であった

4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

硝化槽から漏出するガスをテドラーバッグに採取.



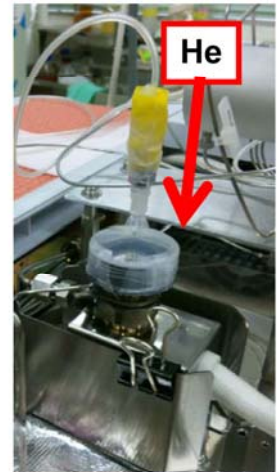
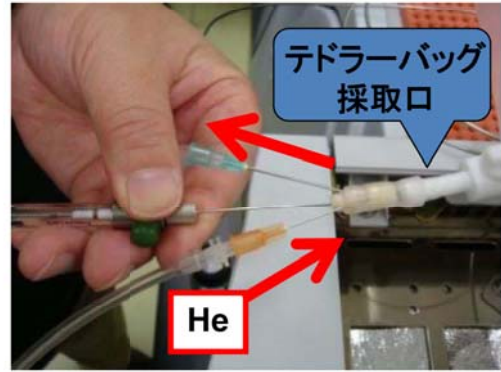
GC/四重極MS (GCMS-QP2010Plus, Shimadzu) を用いてN₂Oを測定.

大気の混入がないようにテドラーバッグ内のガスを50~100μL採取した.



N₂O/NH₄ 転換率:
除去されたNH₄-N量と発生したN₂O-N量から算出.

$$N_2O/NH_4 \text{ 転換率}(\%) = \frac{\text{(発生}N_2O\text{-N量)}}{\text{(流入}NH_4\text{-N量 - 残留}NH_4\text{-N量)}} \times 100$$

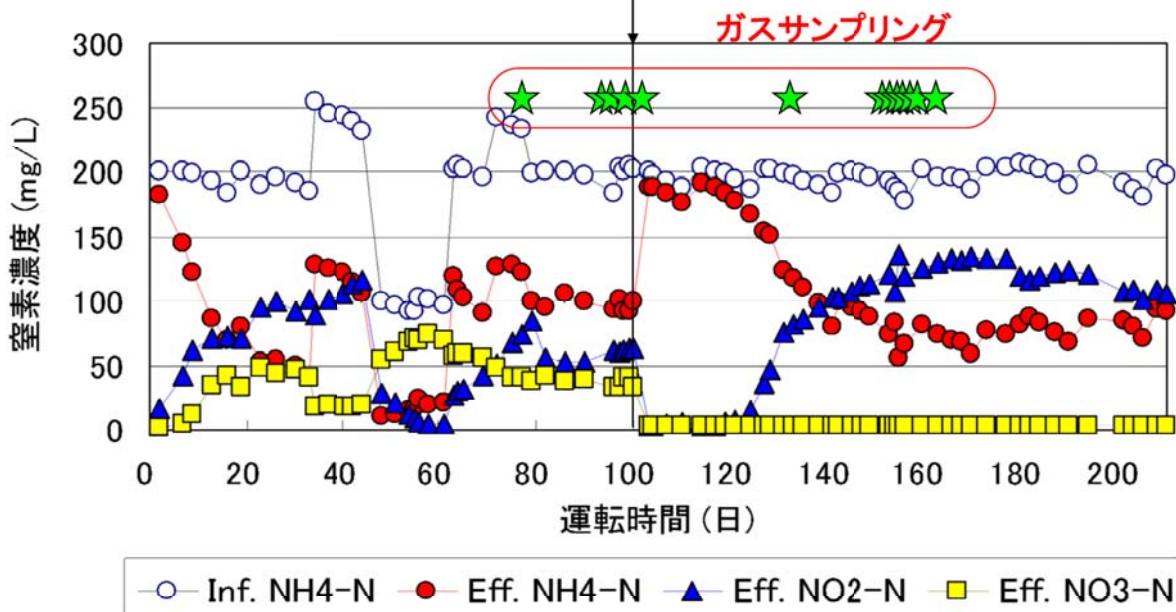


4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

対象: 合成排水処理担体

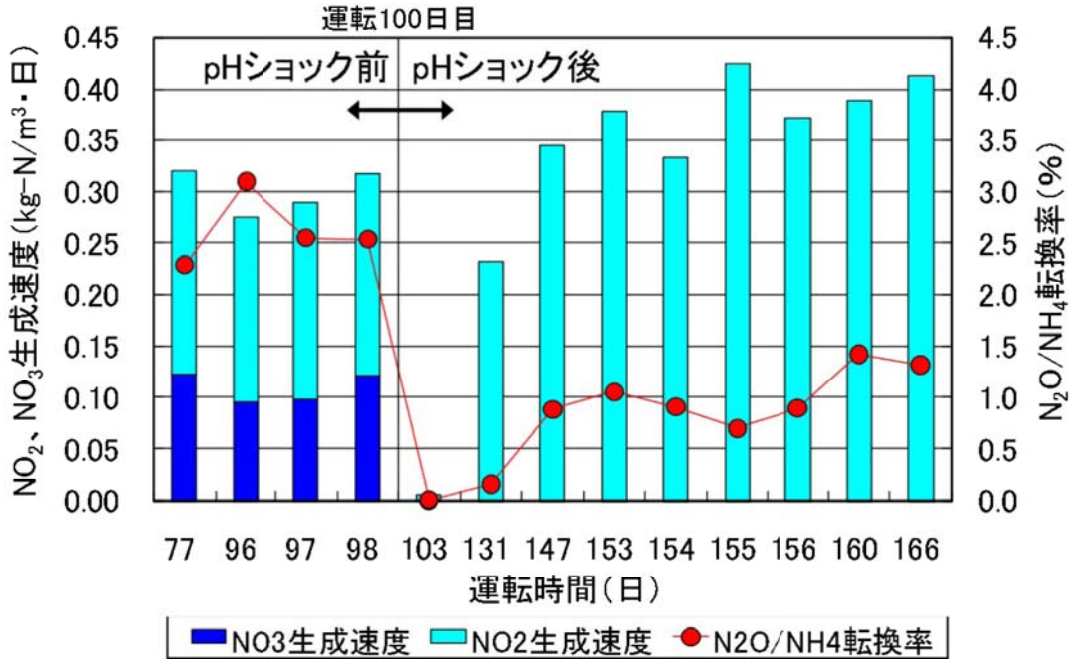
水温18°C, HRT 7.5 h, pH 8, DO6mg/L

pHショック処理 (pH13、1時間)



4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

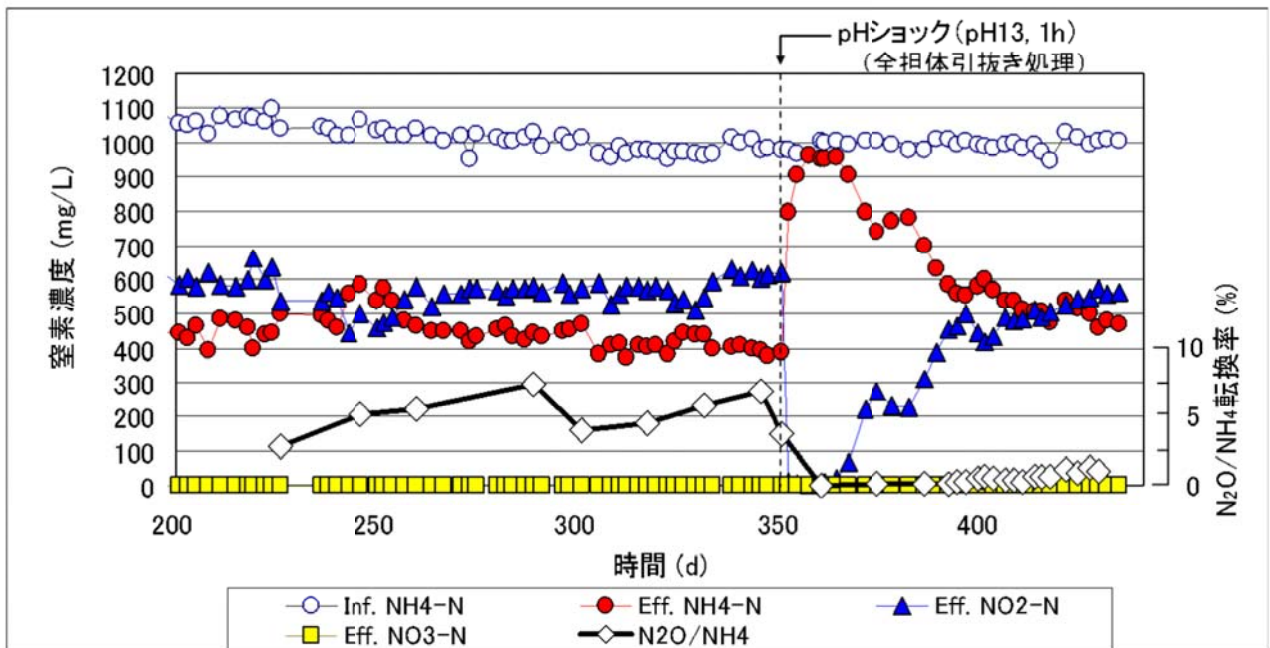
対象: 合成排水処理担体



pHショックによりN₂O/NH₄転換率が減少

4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

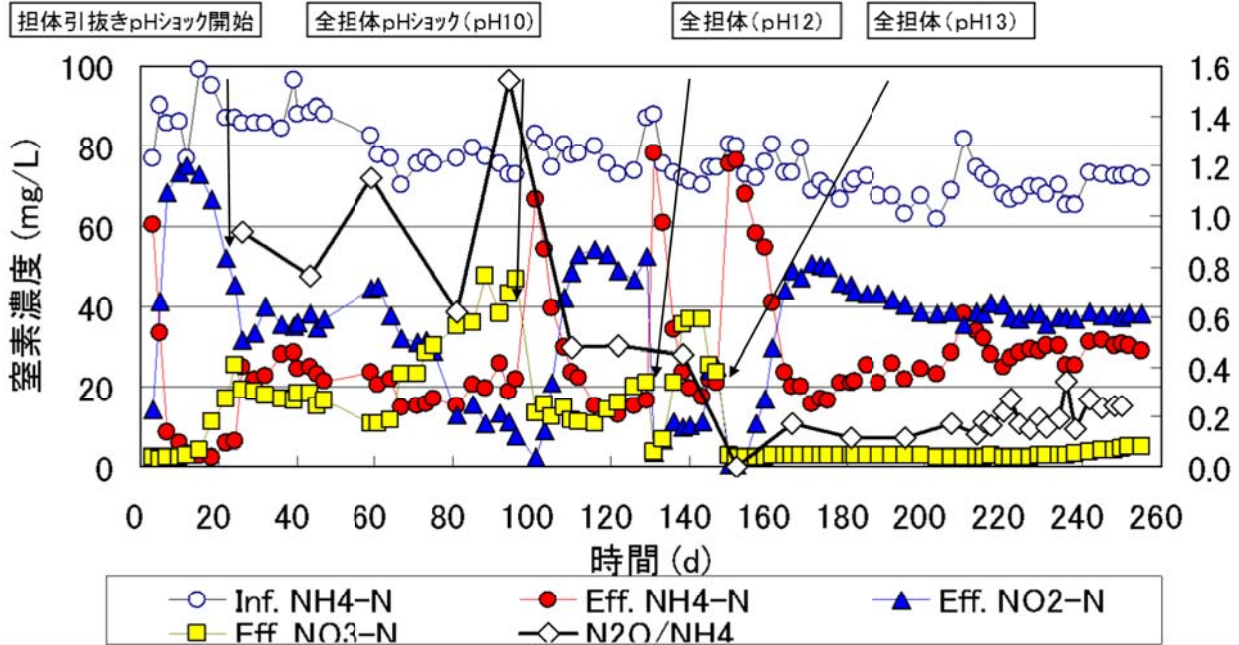
対象: 消化脱水ろ液 処理担体



実廃水処理においてもpHショックによりN₂O/NH₄転換率が減少

4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

対象: 消化脱水ろ液 処理担体

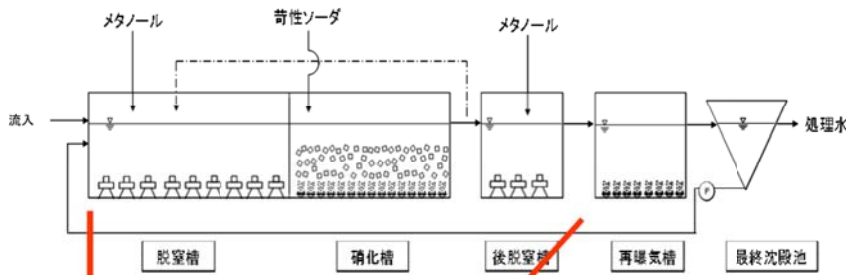


低濃度NH₄廃水処理においてもpHショックによりN₂O/NH₄転換率が減少

目標の達成度

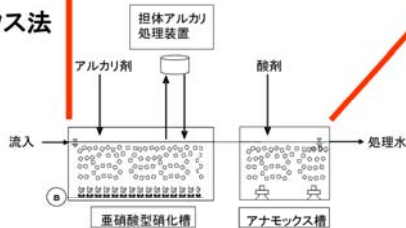
流入水質	NH ₄ -N約1,000mg/L BOD/N比=0.2 処理水量を100m ³ /日規模
処理水質	T-N250 mg/L

担体添加型バーデンフォ法



反応容積 約85%減

アナモックス法

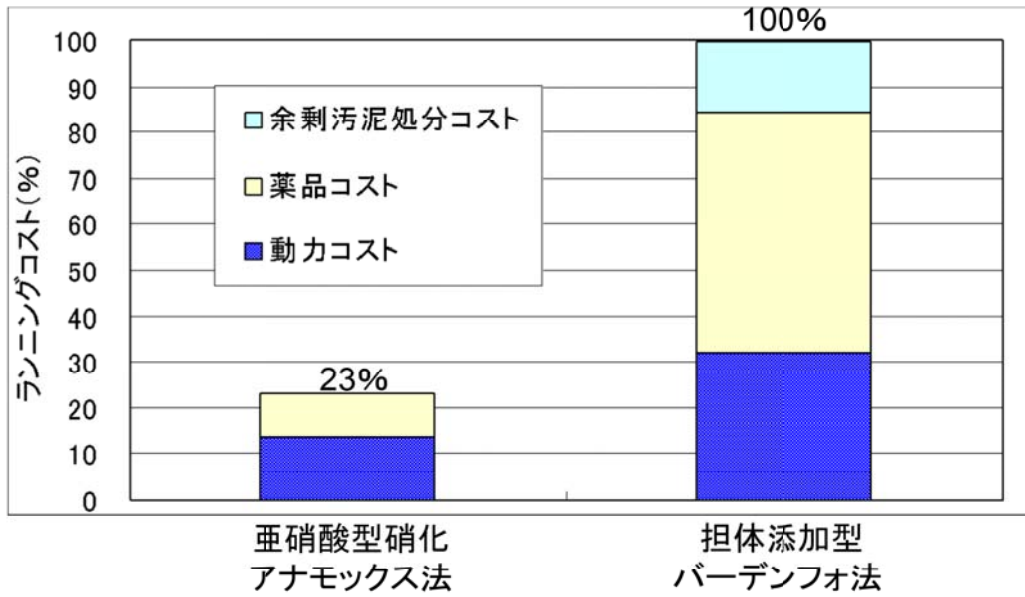


送風動力 50%
攪拌動力 90% } 削減

総動力エネルギー 約58%の削減効果

当社比: バーデンフォ法、アナモックス法

総ランニングコストの比較



当社比：バーデンフォ法、アナモックス法

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

プロジェクトの詳細(公開)

NEDO バイオテクノロジー・医療技術部

委託先 広島大学

01/18

3. 研究開発成果について (1)(中間)目標の達成度

公開

密閉型DHSリアクターによる微生物叢のデザイン化

■ DHS(Downflow hanging sponge)リアクターの利点

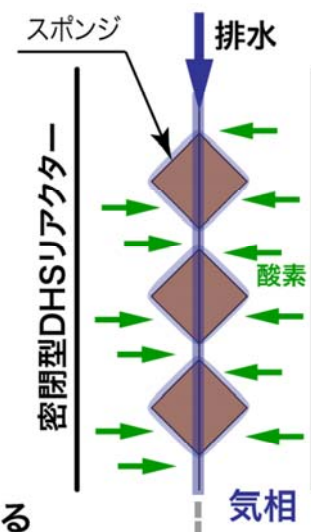
スポンジ担体を気相に吊るしているため

- ① 高濃度に微生物を保持できる
- ② エアレーション等の酸素供給が不要
(気相中から自然に供給)
- ③ 移流によりスポンジ内部にまで
基質・酸素が行き渡る
- ④ 保水性があるためHRTを自由に制御できる

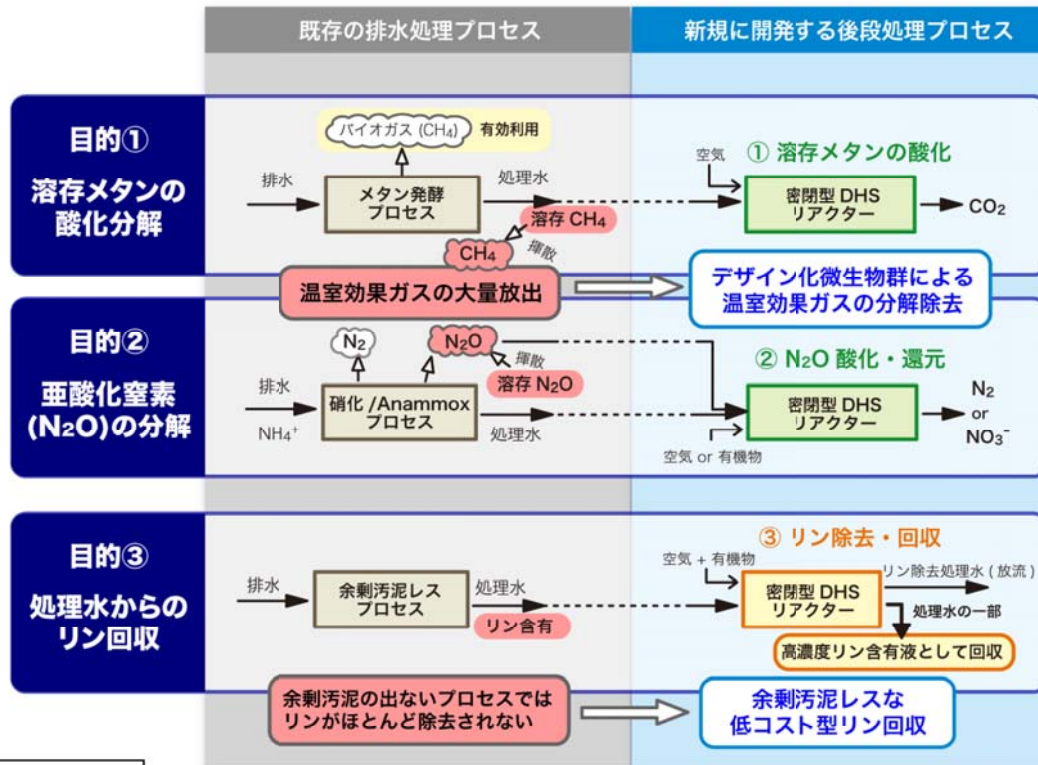
■ 密閉型DHSリアクターの利点

微生物の生育環境を空気供給(送風)の
コントロールで好気・嫌気などに自由にデザインできる

↓
処理対象にあわせた最適な微生物叢をデザイン化し、
既存排水処理を3倍効率化

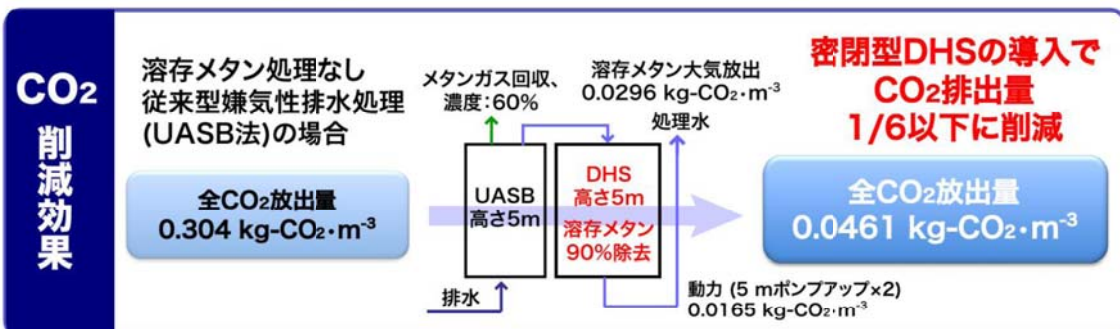
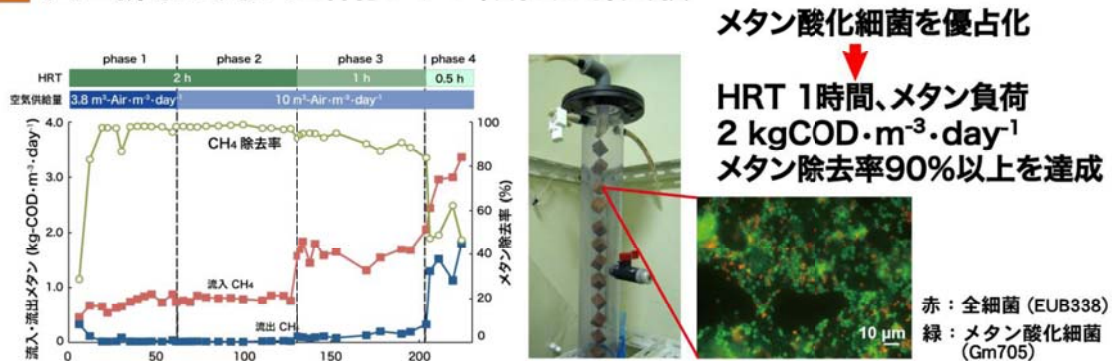


密閉型DHSリアクターを用いた排水処理の3つの高度化



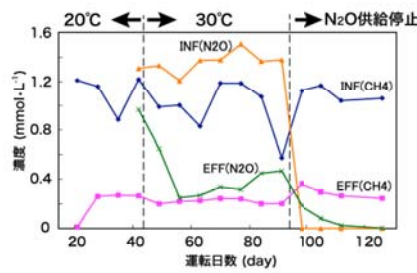
目的①: 溶存メタンの酸化分解による温室効果ガス排出削減

人工排水を用いた溶存メタン酸化分解実験

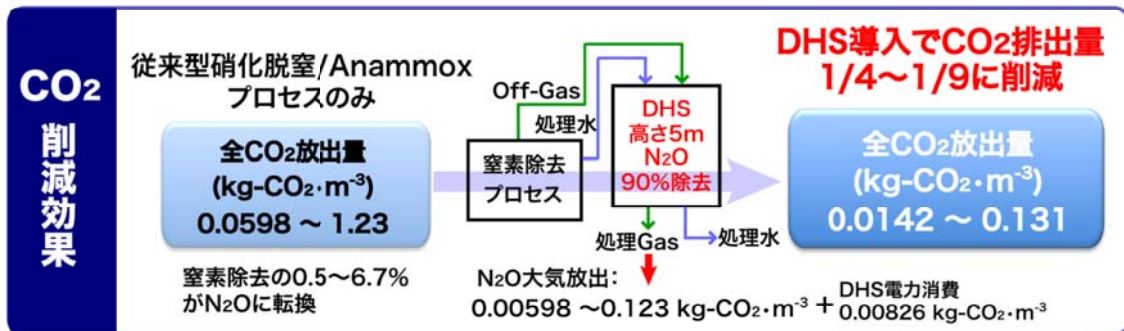


目的②: 亜酸化窒素の分解除去による温室効果ガス排出削減

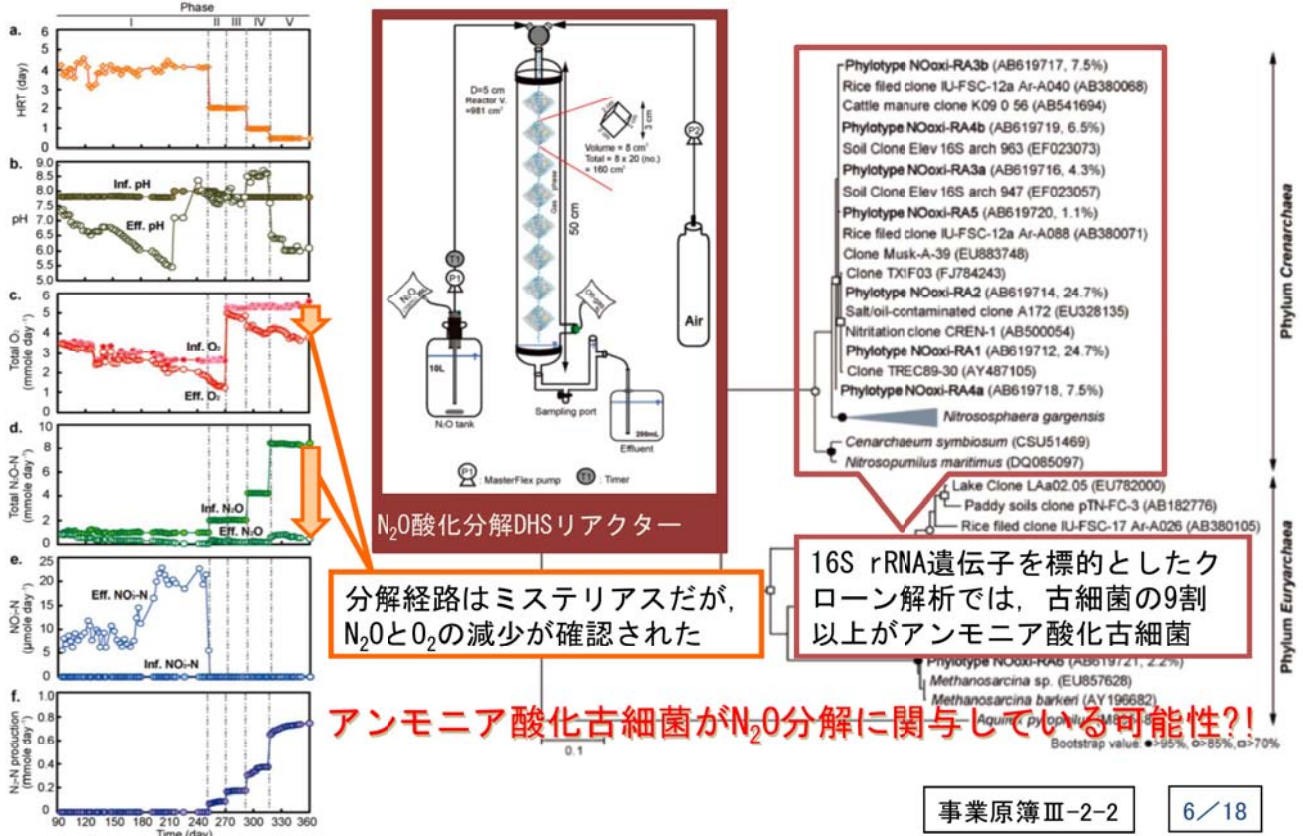
メタンを炭素源とした亜酸化窒素(N₂O)の分解(脱窒)



- 微生物の増殖と亜酸化窒素の減少を確認
N₂O除去速度0.14 kg-N·m⁻³·day⁻¹
- ↓
- 将来的には、メタン酸化DHSと統合し、単一リアクターで温室効果ガスを除去
- 今後は微生物を解析し、亜酸化窒素分解菌を特定する
- 亜酸化窒素の酸化分解処理も検討中

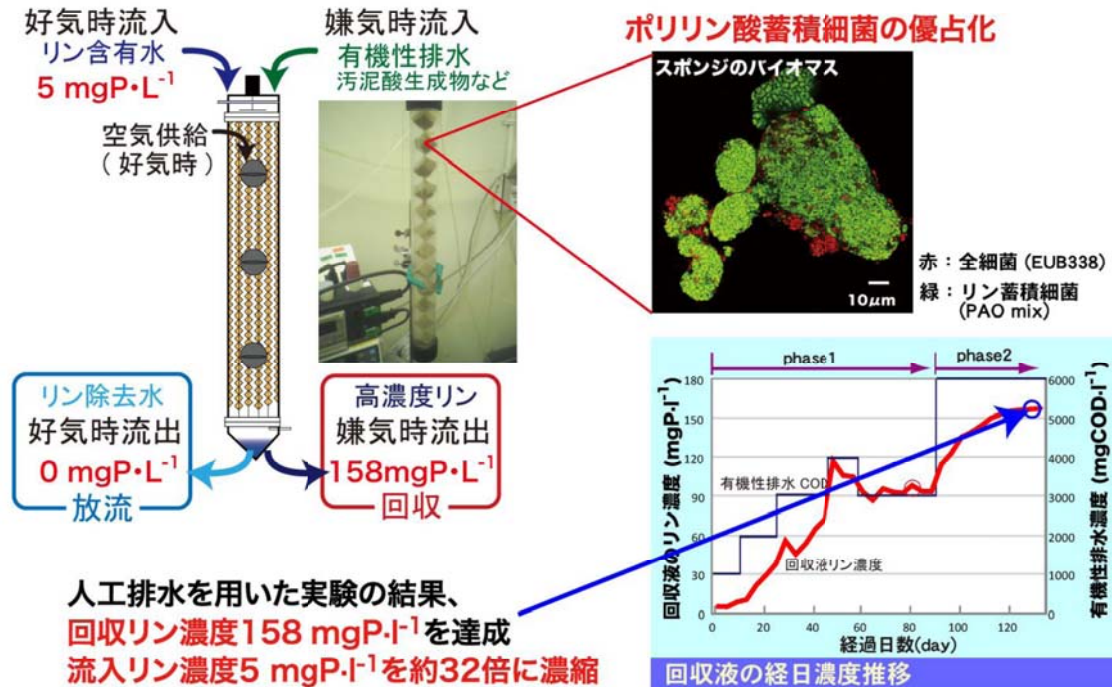


亜酸化窒素の酸化分解処理と微生物群集構造

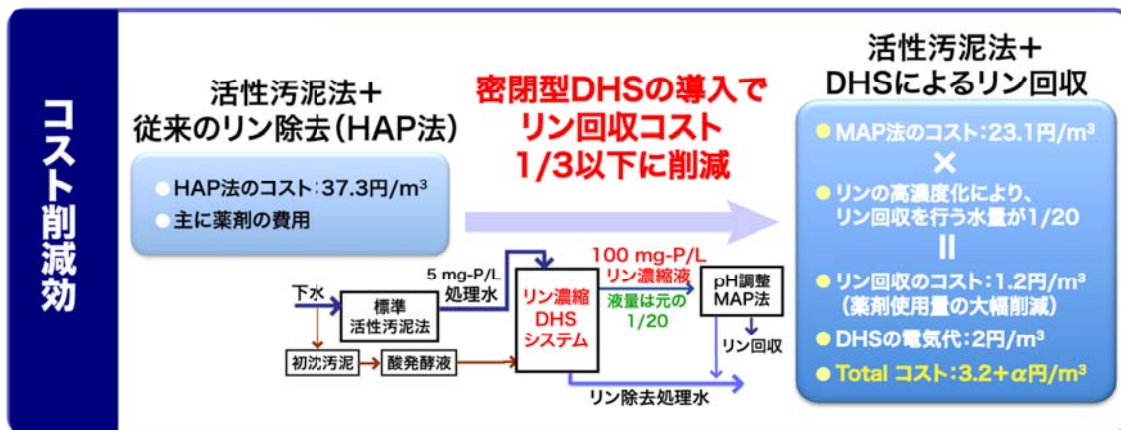


目的③: 余剰汚泥レス排水処理システムからのリン回収

■ 密閉型DHSによる新規なリン回収(特願2009-044797)



DHSを用いたリン回収のコスト削減効果

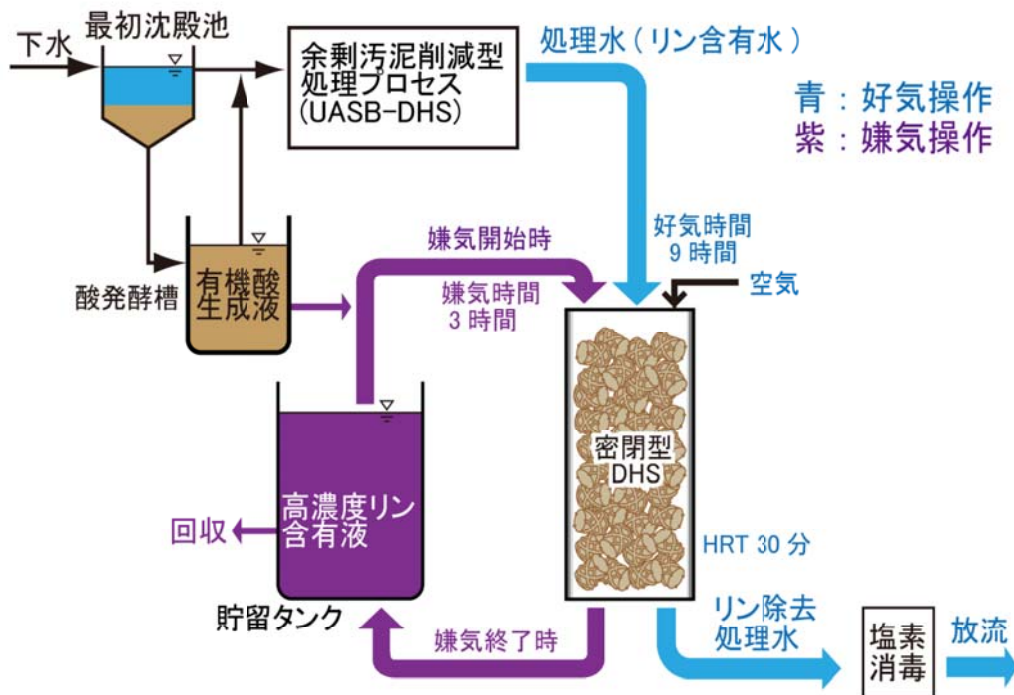


■ パイロット規模プラントによる実証試験へ

実下水(余剰汚泥レスプロセス処理水)からリン除去・回収できることを実証

目標: 濃縮液のリン濃度 $100 \text{ mg-P}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上

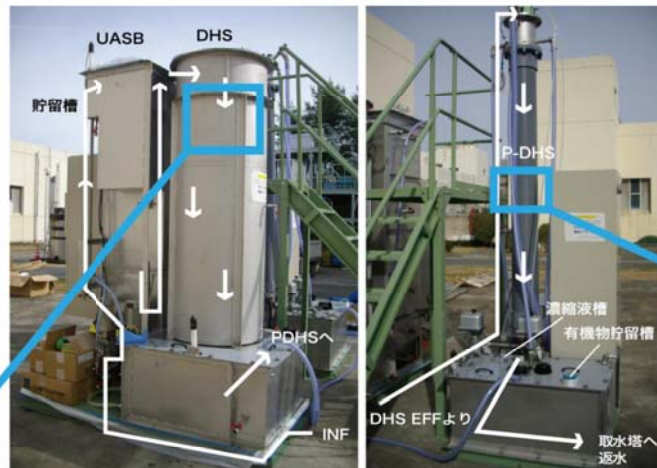
余剰汚泥削減型リン回収システムの概要



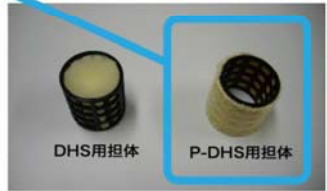
パイロット規模プラントによる実下水からのリン回収の実証

貯留槽容積：100L
 UASB高さ：1.5 m
 UASB容積：500 L
 (HRT 12時間)

DHS高さ：1.5 m
 DHS容積：524L
 DHS有効容積：250L
 (HRT 6時間)



PDHS高さ：2.2m
 PDHS容積：66L
 (HRT 1時間)
 PDHS有効容積：5L
 (HRT 7.2分)
 濃縮液槽：70L



下水処理 UASB-DHS システム リン除去回収 DHS システム

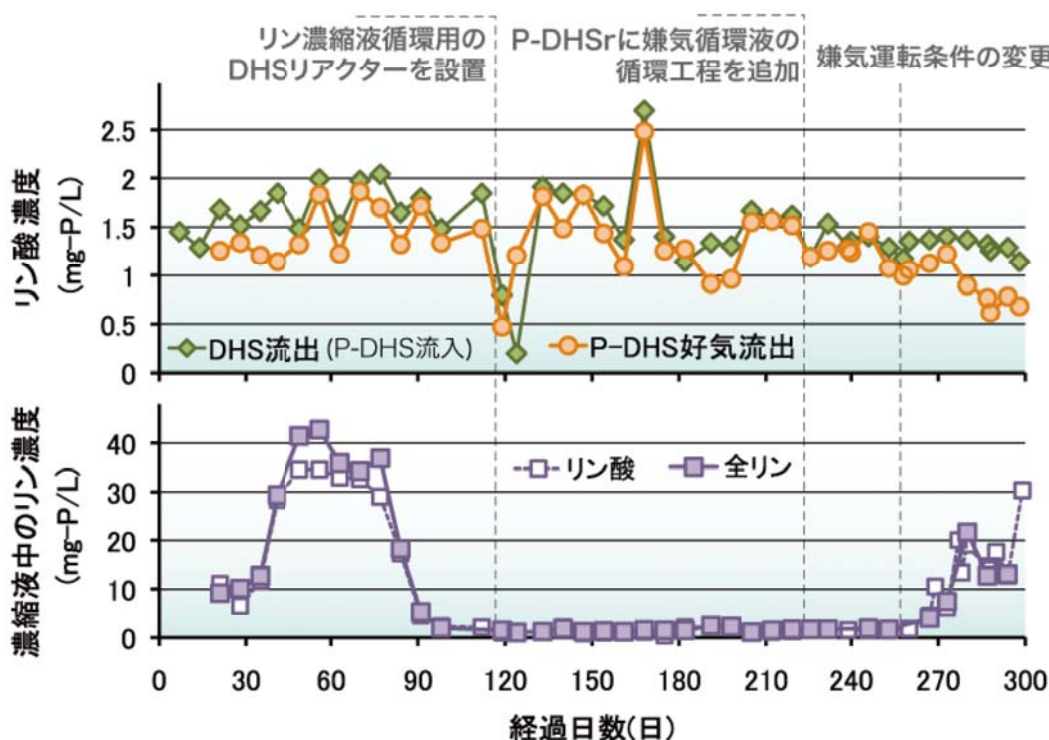
リン除去・回収性能を向上させるノウハウを蓄積し、運転・操作方法を確立

- ・リン濃縮液の好気処理の必要性 ← 循環 DHS リアクターを設置して対応
- ・嫌気運転開始時における、投入有機物の攪拌工程を追加
- ・嫌気運転時間を長く確保することで、リン除去・回収性能が向上

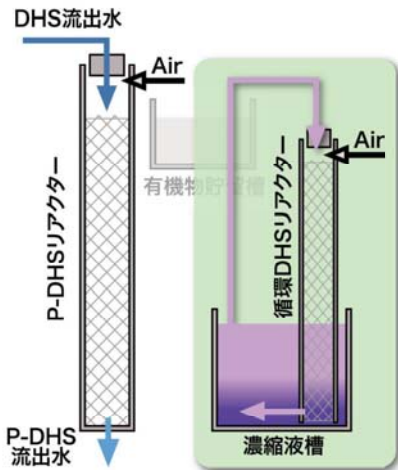
UASB-DHSシステムの処理性能

Parameters	Unit	UASB inf.	UASB eff.	DHS eff.	除去率 (%)
pH	-	7.1 ± 0.2	7.2 ± 0.6	6.5 ± 0.6	
DO	mg/L	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.3	4.8 ± 1.6	
T-CODcr	mg/L	266 ± 58	196 ± 53	36 ± 13	> 90%
BOD	mg/L	171 ± 39	147 ± 34	14 ± 12	> 92%
SS	mg/L	67 ± 38	36 ± 32	3 ± 3	
NH ₄ ⁺	mg-N/L	36 ± 1	35 ± 4	25 ± 6	30%
NO ₂ ⁻	mg-N/L	0	0.2 ± 0.1	1.8 ± 1.8	
NO ₃ ⁻	mg-N/L	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.6	10.5 ± 8.5	
SO ₄ ²⁻	mg/L	391 ± 95	275 ± 74	409 ± 84	

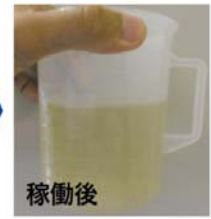
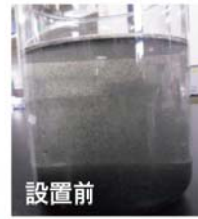
パイロット規模プラントによる実下水からのリン回収の実証



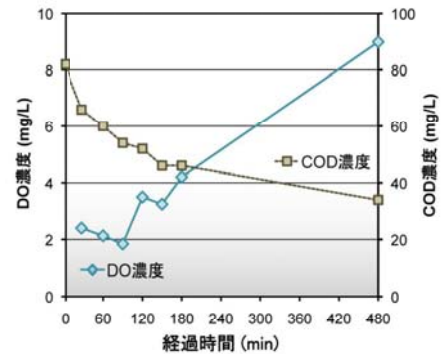
循環DHSリアクターによるリン濃縮液の好気処理



- 担体体積: 11.2 L (G3.2型スポンジ担体 400個充填)
- 流量: 60 L / 9 hrs
- HRT: 1.7 hrs



循環DHSリアクター設置状況



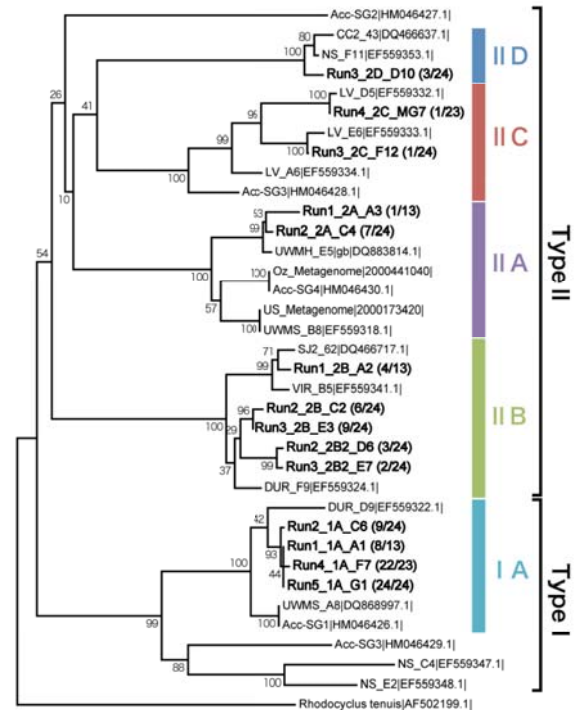
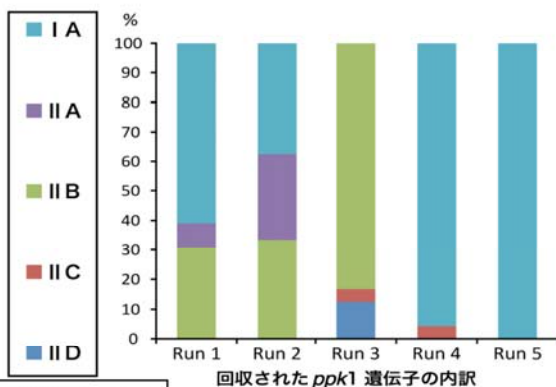
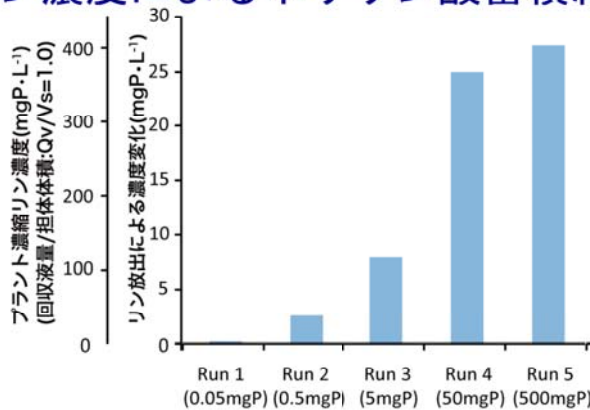
循環DHSリアクター稼働後の濃縮液槽のDO濃度およびCOD濃度プロフィール

P-DHSリアクター好気運転時にリン濃縮液を好気条件で循環させる

循環DHSリアクターの必要性

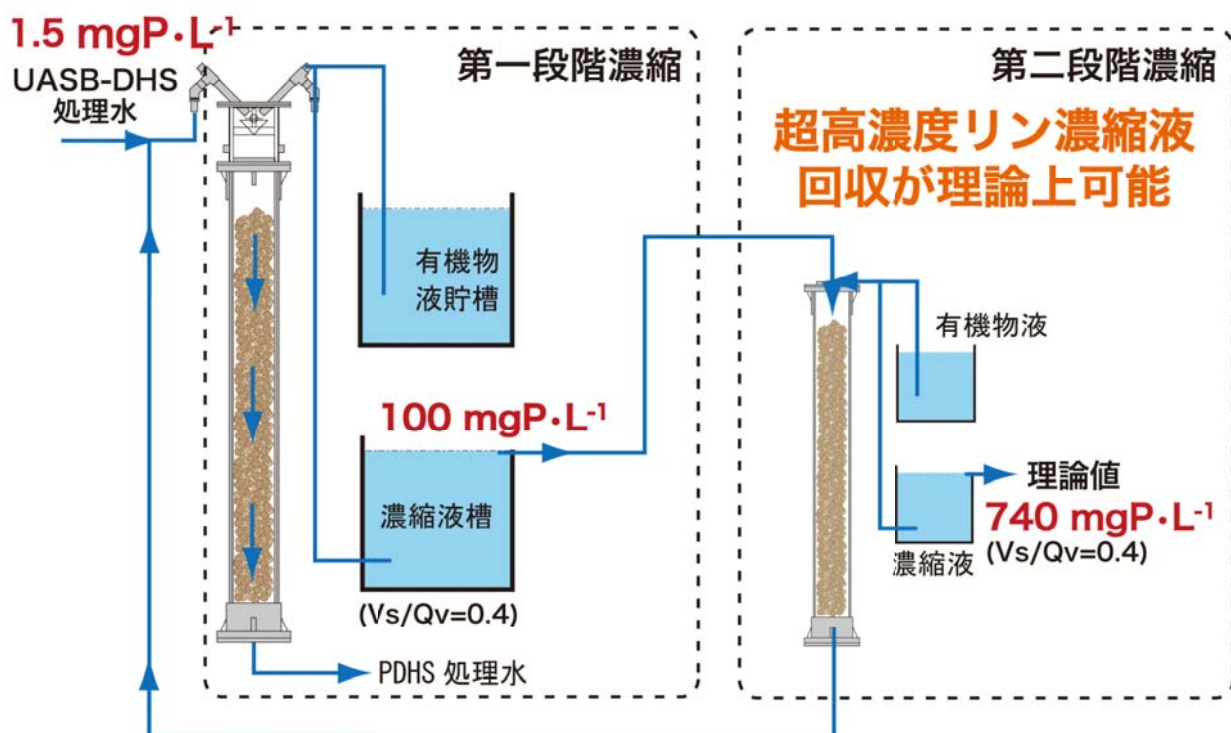
- ・ 残存有機物の除去, 濃縮液の好気化
- ・ 固形物のトラップ

リン濃度によるポリリン酸蓄積細菌の多様性



ppk1 遺伝子に基づく系統樹

超高濃度リン濃縮化アイディア



事業原簿 Ⅲ-2-2

15/18

■ DHSリアクターによる溶存メタンの酸化分解

密閉型DHSリアクターを導入することで、CO₂排出量を1/6以下に削減可能

■ 亜酸化窒素ガス分解DHSリアクターの開発

DHSリアクターを導入することで、CO₂排出量を1/4~1/9に削減可能

■ リン除去・回収DHSリアクターの開発

密閉型DHSリアクターを導入することで、リン回収コストを1/3以下に削減可能

事業原簿 Ⅳ-2

16/18

溶存メタンの酸化分解

溶存メタン・有機物・硫黄・アンモニアを含む模擬排水を用いた場合でも、密閉型DHSリアクターにより、90%以上の溶存メタン除去率をHRT 2時間で達成できることから、**実排水においても同程度の除去性能が期待でき、溶存メタン放散防止は直ちに実用化できる見通しである。**

亜酸化窒素の分解

酸化分解やメタンを用いた還元ともに継続的に除去されることは確認できたが、除去率90%にはまだ至っていない。また、反応に関与する微生物群についても一部しか解明できていない。

実用化に向けては、亜酸化窒素分解微生物の至適環境条件の調査が必要である。

排水処理水からのリン除去・回収

浄化センターに設置したパイロットプラントを用いて、実下水からのリン回収試験を行い、運転・操作方法を確立した。しかし、リン濃度を10倍以上に濃縮できることは実証できたが、実用化の目安となる $100 \text{ mg-P} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上のリン濃縮液の回収までには至っておらず、**実用化に向けてはパイロットプラントの運転を継続して、これを実証する必要がある。**

実用化への見通し

- 模擬排水を用いた今までの検討で、DHSを用いたメタン酸化およびリン回収は当初想定した以上の良い結果を得ている。
- 本技術の基礎となっている好気性DHSリアクターの性能はインドや国内の下水処理場で既に実証されている。
- したがって本プロジェクトをこのまま推進し、実排水を用いてその性能を実証できれば、問題なく実用化される事が期待できる。



インドで稼働中のDHS実証プラント

波及効果

従来 of 下水・排水処理技術に温室効果ガス処理・リン回収DHSリアクターを組み合わせる事で、21世紀型排水処理システムとして日本の技術を世界に向けて発信することができる。

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

プロジェクトの詳細(公開)

NEDO バイオテクノロジー・医療技術部

委託先 北海道大学 地球環境科学研究所

01/19

3. 研究開発成果について (2)成果の意義

資料7-1-3

公開

「バイオフィルム工学による微生物(群)デザイン化」

北海道大学 地球環境科学研究所

事業目的

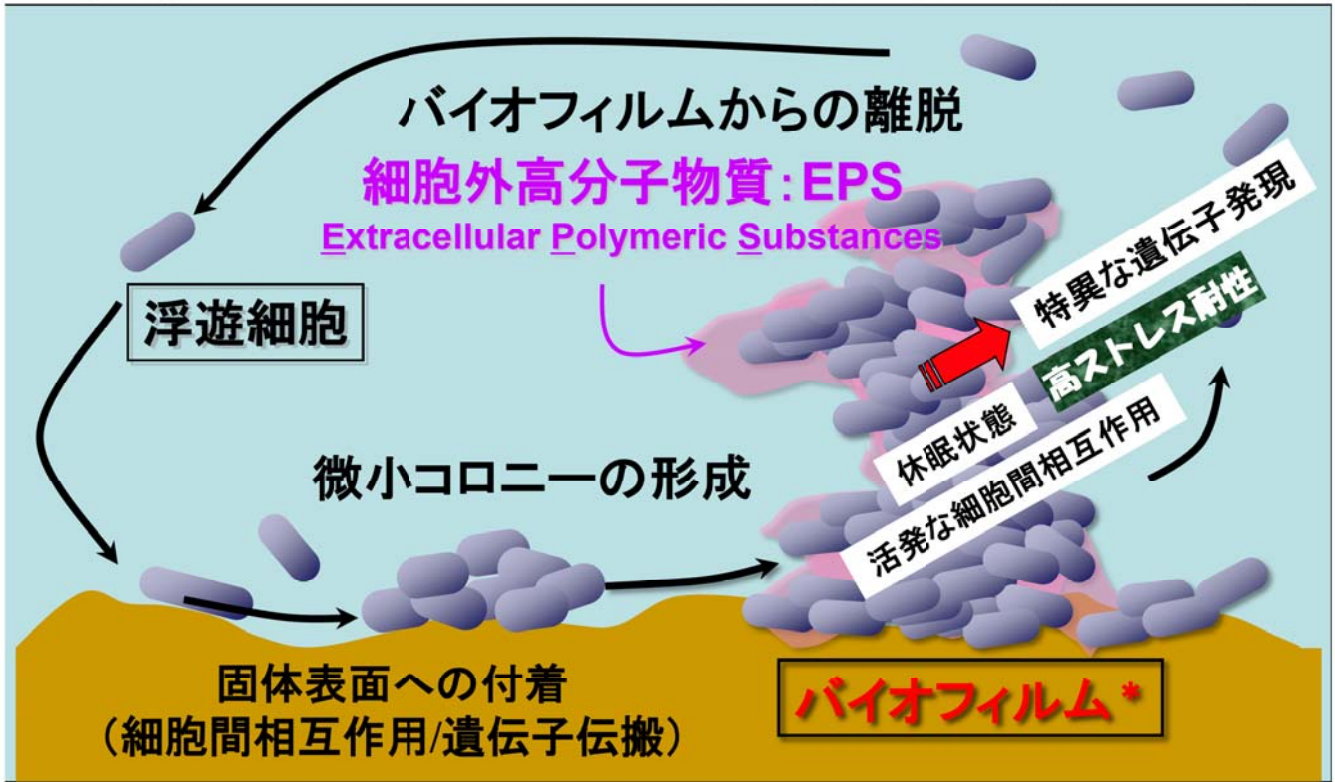
微生物の自然存在形態ともいえる**バイオフィルムの形成という視点から複合微生物系における微生物間相互作用を理解し、さらにこれを制御すること(=バイオフィルム工学)によって廃棄物処理を効率化・安定化するための技術基盤(項目1から3)を開発する。**

【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(達成率100%)。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ル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(達成率80%)。

【項目2】遍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(達成率100%)。

【項目3】植物との共生関係を利用した炭化水素類分解細菌のデザイン化および汚染現場への安定的な導入法を開発する(達成率200%)。

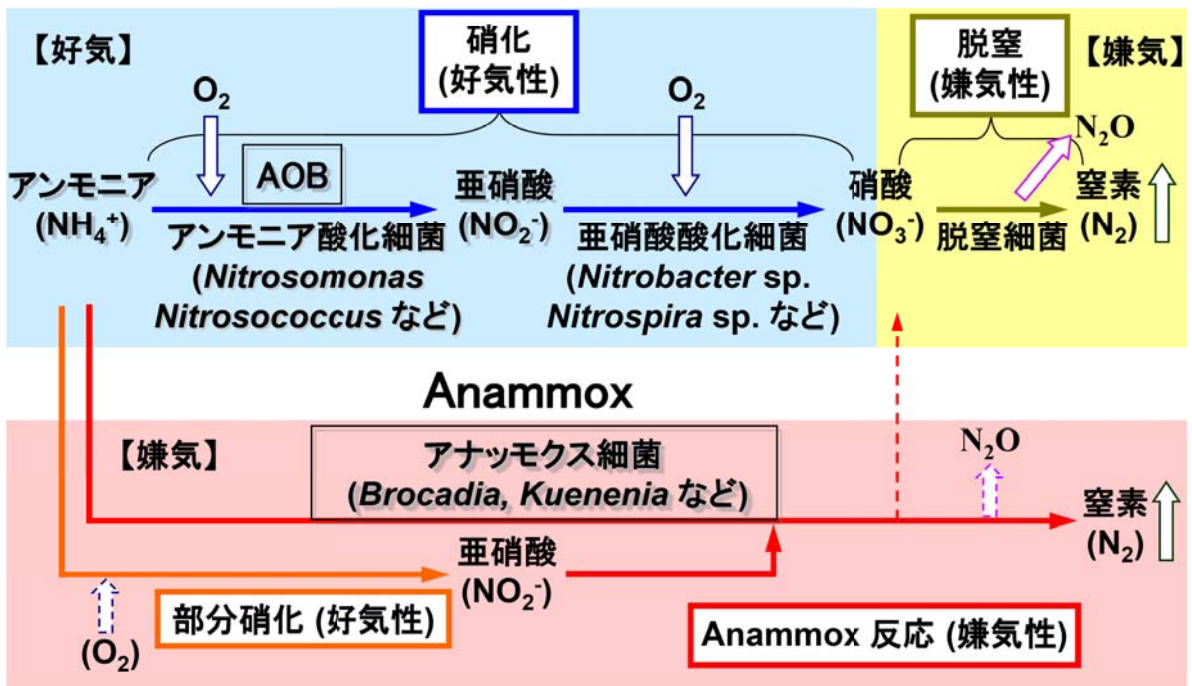
【背景: バイオフィルムの形成過程～微生物の自然な生態】



* バイオフィルムと活性汚泥(フロック)は似た環境と予想される

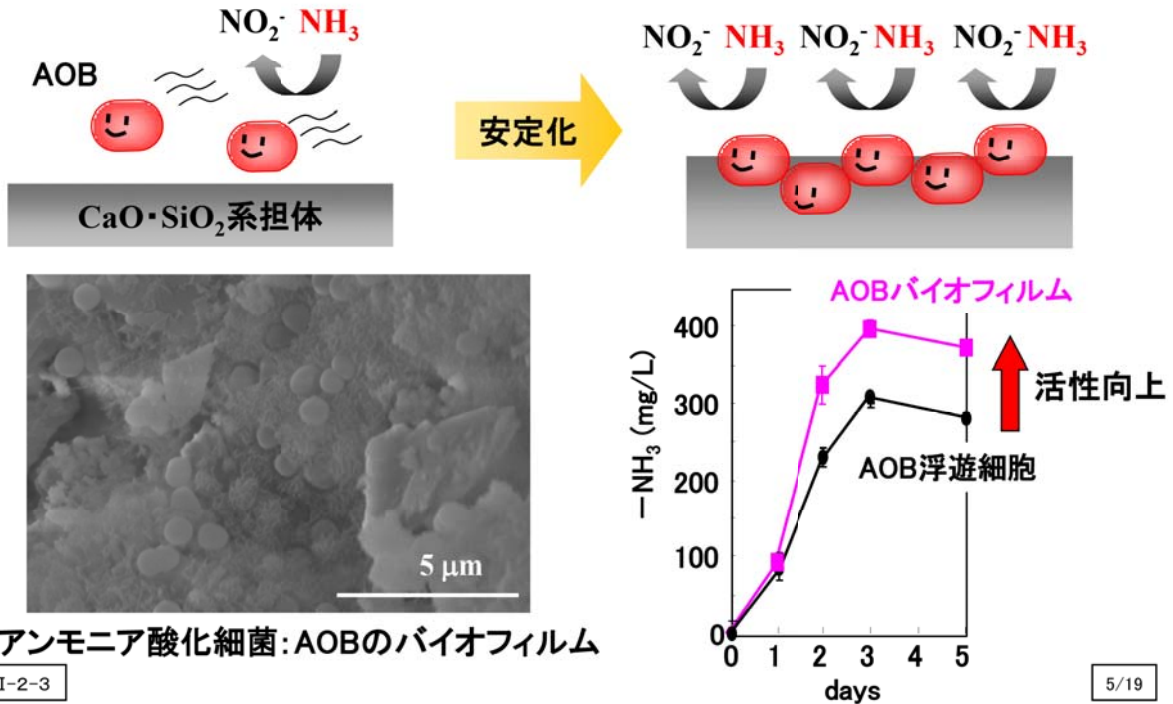
【背景: 細菌群による窒素処理～活性汚泥法と Anammox】

活性汚泥法(二槽式)



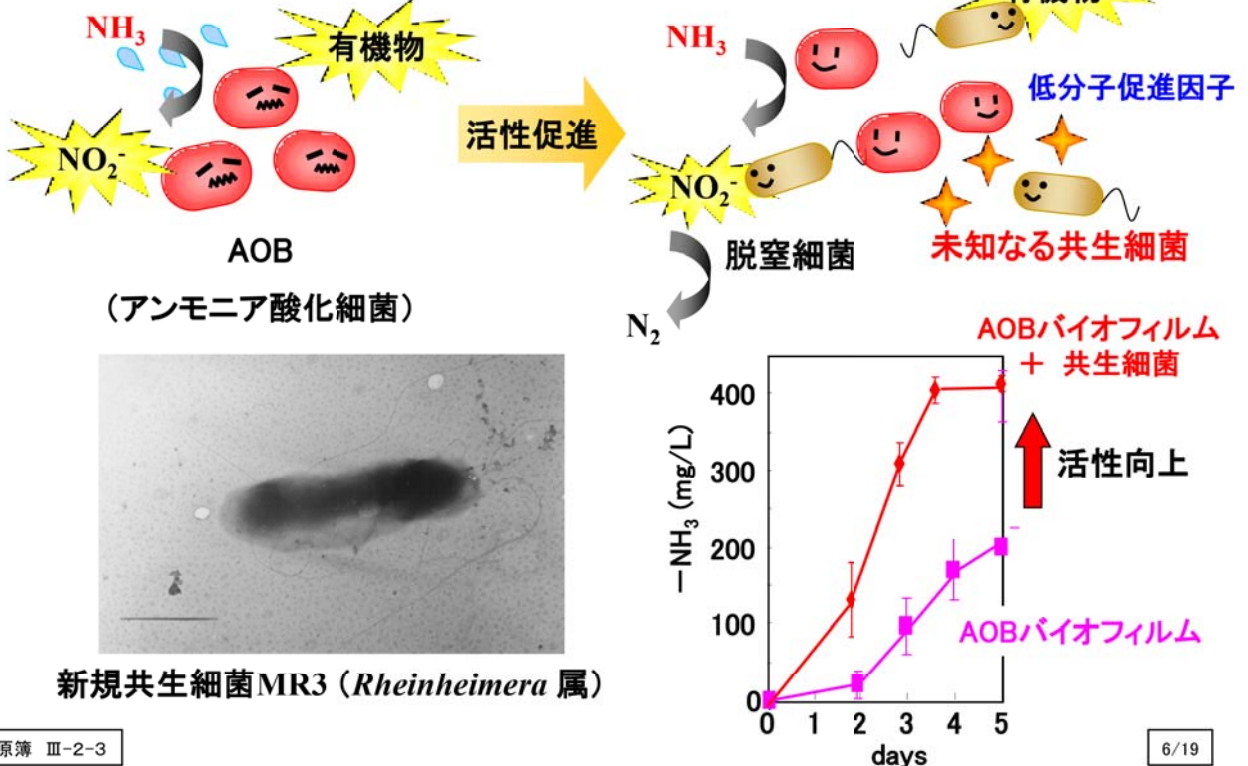
【項目1:アンモニア酸化細菌群のデザイン化 1】

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

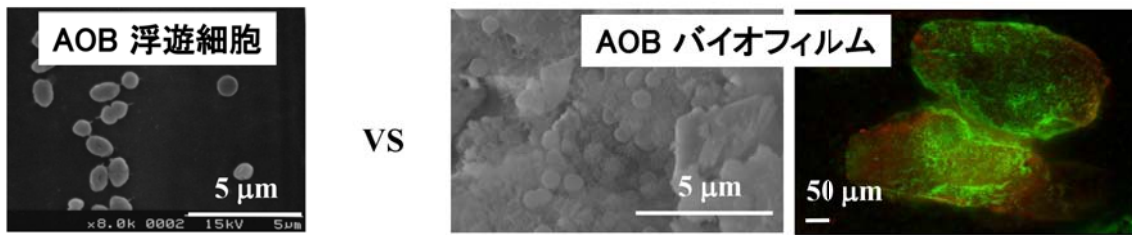


【項目1:アンモニア酸化細菌のデザイン化 2】

活性汚泥から新規共生細菌を発見し、さらにアンモニア酸化
活性の向上に成功した



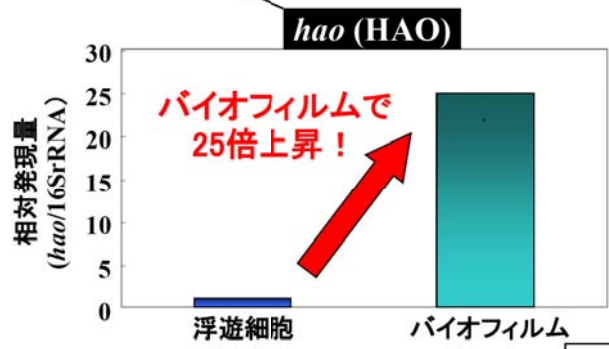
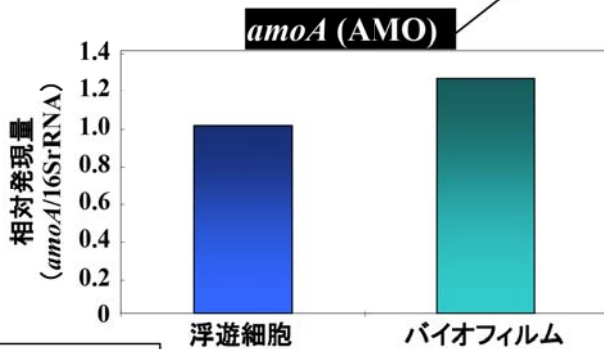
バイオフィルム化によるアンモニア酸化活性向上の原因遺伝子の特定



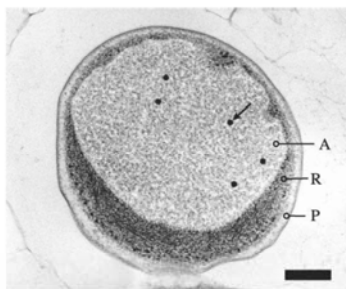
タンパク量 (mg/ L) アンモニア酸化速度 (mg/ L/ 2-days) アンモニア酸化比活性(mg-NH₃/mg-protein/ L/ 2-days)

AOB バイオフィルム	72.5 ± 36.7	438.3 ± 32.2	6.05
AOB 浮遊細胞	120.2 ± 53.9	284.8 ± 13.1	2.37

2.5倍高い！

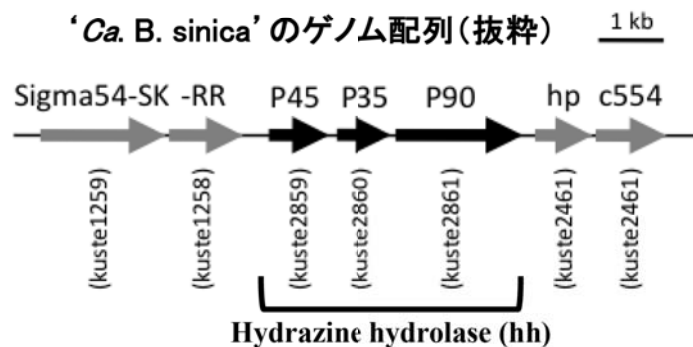


【Anammox細菌 *Ca. Brocadia sinica* 膜タンパク質解析】



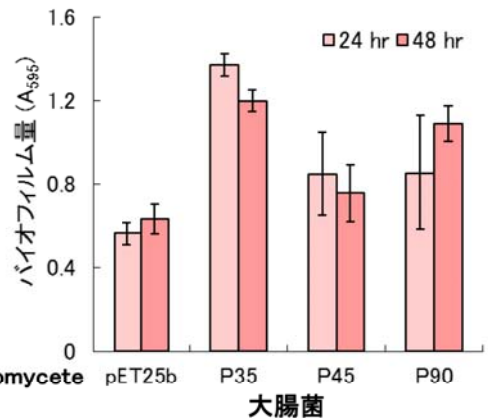
'*Ca. Brocadia sinica*'

'*Ca. B. sinica*' が Anammox 反応に重要な酵素 (hydrazine hydrolase) が膜画分に著量生産されていること、およびその遺伝子発現制御因子 (Sigma54-SK/RR) が '*Ca. K. stuttgartiensis*' とは異なることを見出した。また、hydrazine hydrolaseを大腸菌細胞膜に発現させ、バイオフィルム形成活性が昂進することを示した。Anammox細菌のグラニュール形成に関与？



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, 77-81

組換え大腸菌のバイオフィルム形成



AOB をバイオフィルム化し、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 2~3 倍程度上昇させることに成功した。

AOB のアンモニア酸化活性を促進する新規共生細菌 *Rheinheimera* 属 MR3 を発見し、その作用分子機構の一部を明らかにした。

▶ 活性汚泥内の複合微生物相互作用の理解が進んだ。

AOB を $\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ 系担体にバイオフィルム化させ、そのアンモニア代謝活性促進機構を遺伝子レベルで明らかにした (*hao* 高発現を世界で初めて示した)。

▶ 擬似的な活性汚泥環境における AOB アンモニア代謝活性促進機構の理解に貢献した。

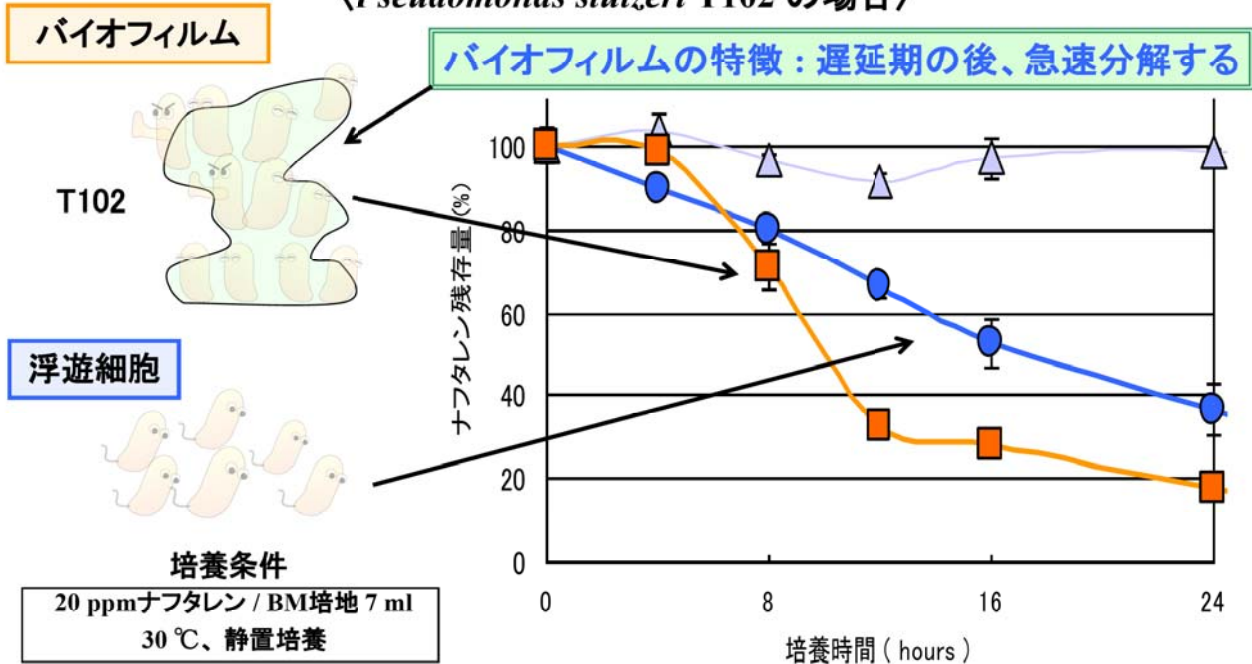
膜タンパク質解析によって、*Ca. Brocadia sinica* の Anammox 反応の特徴の一部を明らかにした。グラニュール形成への関与を間接的に示唆した。

▶ 生理学的特性で不明な点が多い Anammox の理解が進んだ。

【項目2: 原油汚染土壌浄化細菌 T102 のデザイン化】

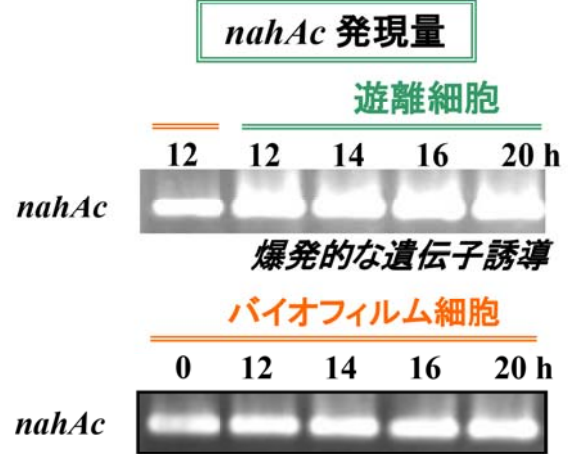
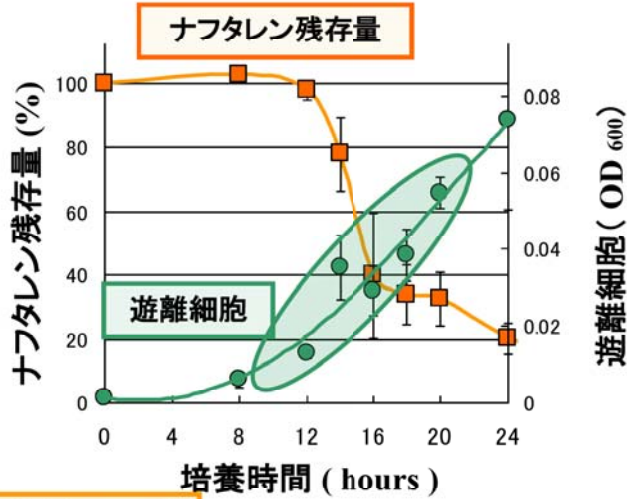
〈バイオフィルムと浮遊細胞のナフタレン分解活性比較〉

〈*Pseudomonas stutzeri* T102 の場合〉

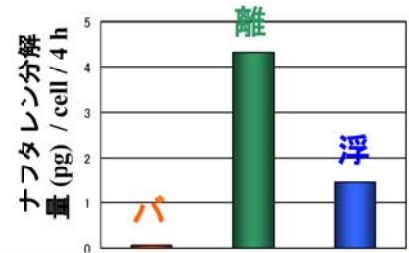
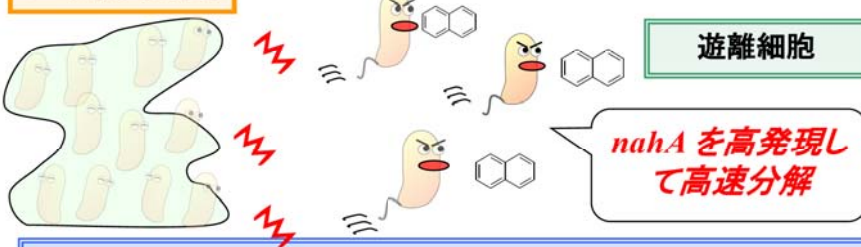


バイオフィルムと浮遊細胞では T102 のナフタレン分解特性が異なる

〈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〉



バイオフィルム



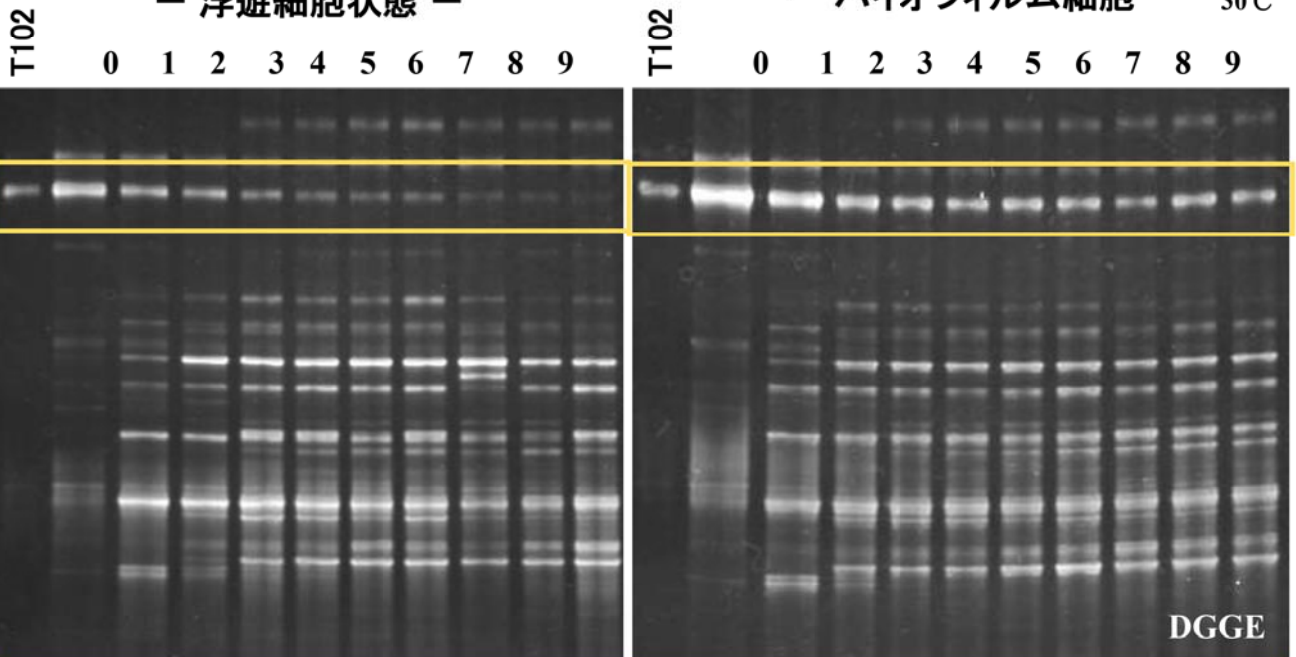
ナフタレン急速分解は、バイオフィルムから遊離した高活性細胞に由来する

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

Pseudomonas stutzeri T102 (□) vs 汚染土壌細菌群

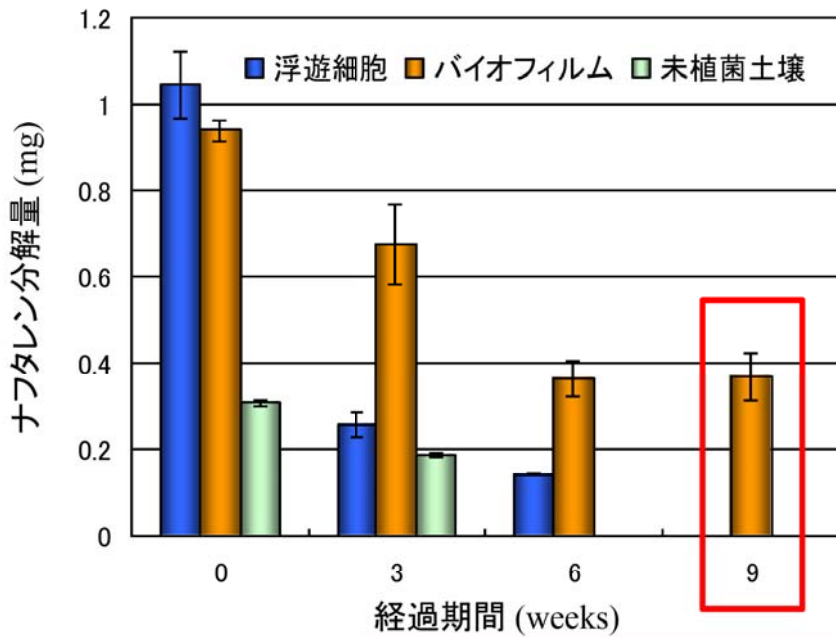
— 浮遊細胞状態 —

— バイオフィルム細胞 — 30°C



浮遊細胞よりもバイオフィルム細胞の方が実汚染土壌に長期間定着できる

〈T102を導入した実汚染土壌のナフタレン分解活性比較〉



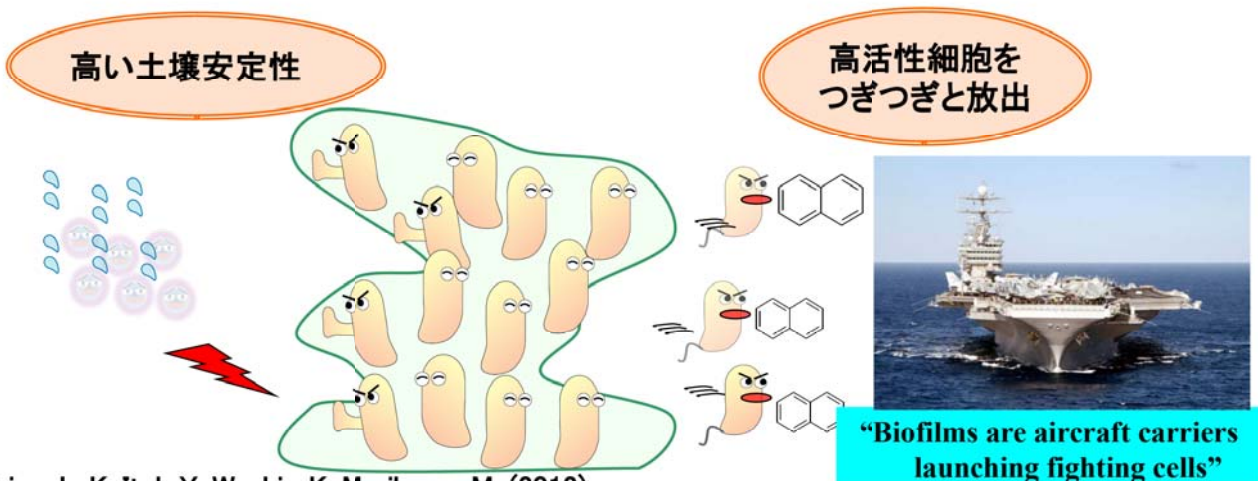
＜培養条件＞
 2 mg ナフタレン / BM培地 20 ml
 土壌 0.5 g 植菌後
 30 °C、36 時間 静置培養

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

【項目2】 【まとめ】 原油汚染土壌浄化細菌のデザイン化

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。

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」であることを初めて発見した



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, 226-233

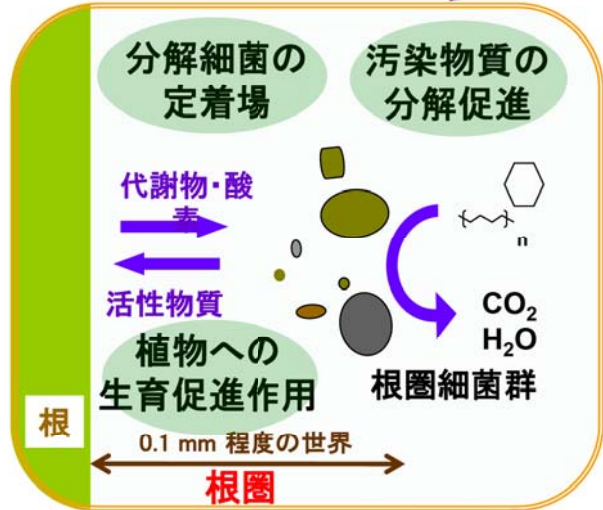
【植物—根圏細菌群のデザイン化コンセプト】



根圏バイオフィルム工学：
植物と根圏細菌の共生作用を高度利用する環境浄化法

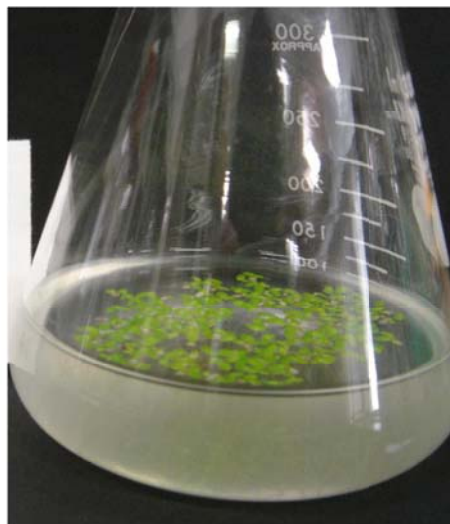
＜根圏バイオフィルム工学の利点＞

- ・ 植物根から代謝物や酸素が供給
⇒ 分解細菌の生育促進、
代謝活性化
- ・ 分解細菌に定着の場を提供
⇒ 付着することで安定に生育
- ・ 処理後に投入細菌の回収が容易
⇒ 二次汚染(残留)を防止
- ・ 細菌が植物の生育を促進する



分解微生物を植物に付着させることにより、
光エネルギーによる省エネ型環境浄化が可能

＜除菌ウキクサへの根圏細菌再付着の様子＞



0 時間

OD₆₀₀ = 0.3

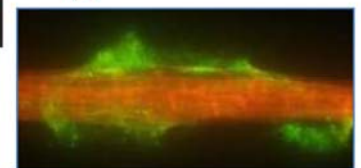


72 時間後

OD₆₀₀ = 0.03 - 0.05

注) OD₆₀₀ : 600 nm濁度 = 浮遊細菌数の指標

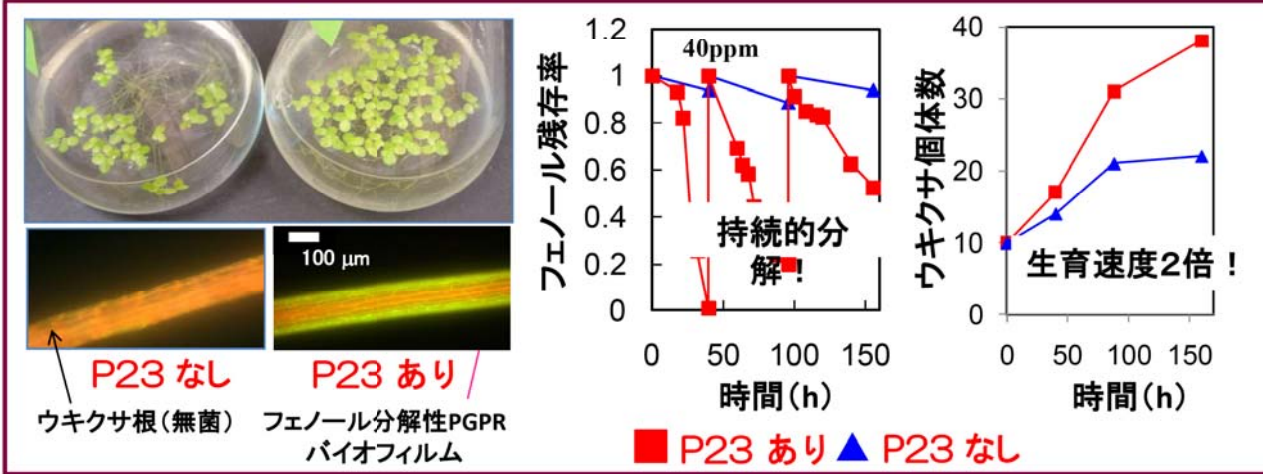
根圏バイオフィルム



100 μm

ウキクサ根表面を有用根圏細菌で優先化させる技術を確立した

根圏バイオフィルム工学により、持続的水質浄化と植物の生育促進を同時に実現することに成功(世界初!)
Acinetobacter calcoaceticus P23



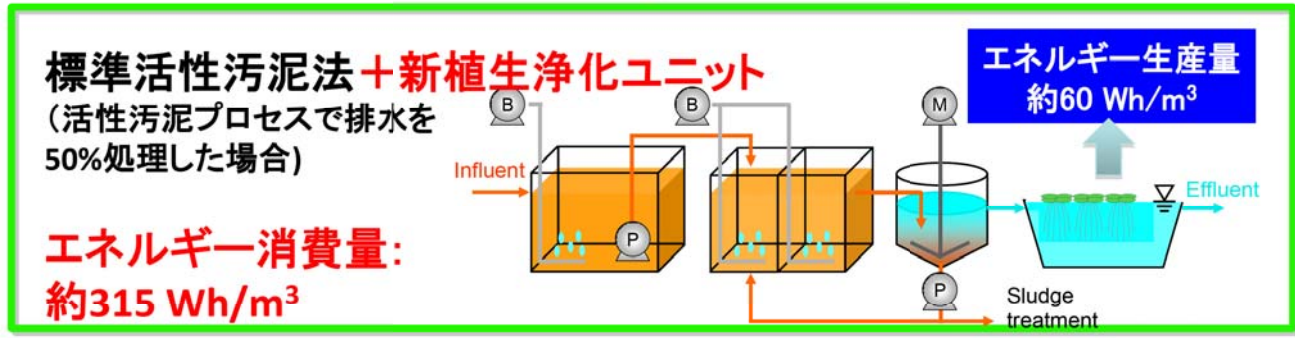
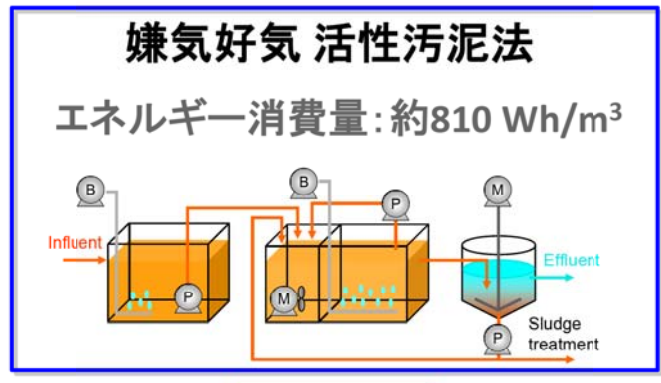
P23 : 植物生育促進菌 (PGPR) かつ 炭化水素類分解菌 & 回収可能 (二次汚染なし)

「新規水草根圏微生物」特願2008-099213号

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, 6470-6474+

4. 実用化の見通しについて (1) 成果の実用化可能性

項目3 ~ ケース1 : 省エネルギー型高効率栄養塩除去システム ~



項目 3 ~ ケース 2 : 二次処理水の水質安定化 ~

日本の工場廃水仕上げ処理

