

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03000

研究課題名(和文) 下水汚泥の嫌気性消化高効率化に資する土着PHA蓄積菌を活用した汚泥改質技術の開発

研究課題名(英文) Development of sludge property modification technology using PHA-accumulating bacteria for efficient anaerobic digestion

研究代表者

井上 大介 (INOUE, Daisuke)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：70448091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、下水汚泥のPHA高含量化の鍵を握ると考えられるRhodocyclaceae科細菌の汚泥中における分布とPHA蓄積特性を明らかにした。特に、PHA蓄積に有望な炭素源の種類や優れたPHA蓄積能の発揮に有効な環境条件を明らかにし、PHA高含量化のためのRhodocyclaceae科細菌の制御法につながる知見を得た。また、下水汚泥からPHA蓄積菌(特にRhodocyclaceae)を短期間で集積する方法を明らかにした。これらの知見は、本研究で提案する汚泥改質技術の実際の汚泥処理における適用を大きく前進させ、下水汚泥からのエネルギー回収の向上につながるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rhodocyclaceae科細菌の下水汚泥中における分布やPHA蓄積能に関する知見はこれまでにほとんどなく、本研究で得たそれらの知見は学術的に新規性が高く、今後の関連研究を後押しする重要なものといえる。また、本研究で明らかにしたPHA蓄積菌の迅速集積法などは、下水汚泥からの資源・エネルギー回収に活用され得るポテンシャルを有していると考えられることから、本研究の成果は社会的にも大きな意義を有するものといえる。

研究成果の概要(英文)：This study clarified the distribution of Rhodocyclaceae, which would be a key player for increasing PHA contents, in activated sludge and their PHA accumulation ability. In particular, this study identified the carbon sources and the environmental conditions favorable for efficient PHA accumulation by Rhodocyclaceae members. This study also clarified that aerobic dynamic discharge process is a suitable method to enrich PHA-accumulating bacteria, especially Rhodocyclaceae, within a very short period. The findings obtained in this study will lead to the practical application of our proposed technology, which improves the energy recovery from waste activated sludge.

研究分野：生物環境工学

キーワード：バイオマス利活用 下水汚泥 ポリヒドロキシアルカン酸 嫌気性消化 微生物解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下水処理場では、下废水の処理に伴い大量の汚泥が発生しており、その量は産業廃棄物の約 2 割に達している。現状では、多くのエネルギーをかけて処分されているが、近年では、下水汚泥を、恒常的に下水処理場に集約される、質的・量的に安定した貴重なバイオマス資源と捉え、資源やエネルギーとして有効利用することが強く求められている。特に、下水汚泥の約 8 割を占め、主にエネルギー回収に利用される有機物の有効利用率は未だに低く、下水汚泥のエネルギー化促進が重大な課題とされている。

バイオマスのエネルギー化技術の中で、嫌気性消化によるメタン回収は、高含水率のバイオマスに適用でき、減容・減量化にもつながることから、下水汚泥のエネルギー化の主力技術と位置づけられている。しかし、嫌気性消化における下水汚泥の分解率は 50%程度であり、特に微生物細胞を主成分とする余剰汚泥の分解率が 30-40%と低く(引用文献)、下水汚泥からのエネルギー生産のボトルネックとなっている。このため、嫌気性消化を高効率化するためには、余剰汚泥を改質し、分解性を向上させる前処理が必要である。

そこで本研究では、余剰汚泥の分解性を高め、エネルギー転換効率を向上させるための汚泥改質技術として、汚泥のポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の高含量化に着目した。PHA は微生物が炭素・エネルギーの一時貯蔵物質として蓄積する脂肪族ポリエステルであり、生分解性、生体適合性、熱可塑性に優れたバイオプラスチック原料として知られているが、近年の研究により、生分解性に優れた PHA を汚泥に高蓄積させることにより、嫌気性消化によるメタン生成が高効率化し、生成量も増加することが見出だされている(引用文献)。

他方、下水処理場の一般的な活性汚泥には PHA 蓄積菌と非 PHA 蓄積菌が共存し、PHA 蓄積能は必ずしも高くないことから、余剰汚泥に多くの PHA を蓄積させるためには、汚泥中の PHA 蓄積菌を集積させることが重要となる。PHA 蓄積菌の集積については多くの既往研究がなされてきており、Feast-Famine 法の原理を活用した Aerobic dynamic discharge (ADF) 法が有効な PHA 蓄積菌集積法として汎用されているが、同法では集積に月レベルの期間が必要となることから、恒常的に発生する下水汚泥の処理及びエネルギー化には不適であると考えられる。一方、我々の過去の研究において、*Rhodocyclaceae* 科 PHA 蓄積菌が下水汚泥の PHA 高含量化のキープレイヤーであることが見出されたことから、それらの PHA 蓄積菌を選択的に制御する、あるいは優占化・活性化させることができれば、余剰汚泥への PHA 高含量化をより迅速に達成できる可能性がある。

2. 研究の目的

上述した背景から、本研究では、嫌気性消化による下水汚泥からのメタン生成の高効率化に資する環境低負荷な汚泥改質技術として、下水汚泥中の *Rhodocyclaceae* 科 PHA 蓄積菌を活用して PHA 含量を短期間で大幅に高める技術を開発することを目指し、*Rhodocyclaceae* 科細菌の下水汚泥中における分布及び PHA 蓄積特性に関する検討、下水汚泥の迅速 PHA 高含量化方法の検討、PHA 含量とメタン生成ポテンシャルの関係の評価を行った。

3. 研究の方法

(1) *Rhodocyclaceae* 科細菌の汚泥中における分布及び PHA 蓄積特性に関する検討

下水汚泥中における *Rhodocyclaceae* 科細菌の分布を明らかにするため、都市下水処理場より採取した活性汚泥の 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスを行い、細菌群集全体に占める *Rhodocyclaceae* 科細菌の割合と主な構成属種を調査した。

また、代表的な *Rhodocyclaceae* 科細菌として、*Azoarcus* 属、*Thauera* 属、*Zoogloea* 属を対象として詳細な検討を実施した。すなわち、分譲機関より入手した *Azoarcus evansii* NBRC 107771、*Azoarcus indigenus* DSM 12121、*Azoarcus olearius* DSM 100663、*Thauera butanivorans* NBRC 103042、*Thauera humireducens* DSM 100429、*Thauera linaloolentis* NBRC 102519、*Thauera selenatis* ATCC 55363、*Zoogloea oryzae* NBRC 102407、*Zoogloea ramigera* NBRC 15342、*Zoogloea resiniphila* JCM 21744 を試験菌株とし、PHA 合成に関与する *phaC* 遺伝子の保有確認、増殖特性の評価、利用可能な炭素源の探索、PHA 蓄積能の評価を行った。

(2) 下水汚泥の迅速 PHA 高含量化方法の検討

下水汚泥の迅速 PHA 高含量化方法として、以下の検討を行った。いずれの検討でも、活性汚泥は都市下水処理場より採取し、PHA の基質となる炭素源には酢酸ナトリウムを使用した。

1 つ目の方法として、集積を介さず、下水汚泥の PHA 含量を直接高める方法について検討した。ここでは、PHA の基質となる炭素源の投入方法として、一度にまとめて投入する回分方式と、培養中の pH 変化に伴い炭素源を添加するフェドバッチ方式(事前に炭素源を添加するもの、しないもの)について検討した。

2 つ目の方法として、PHA 蓄積菌の迅速集積について検討した。既往研究では ADF 法が汎用されているが、本研究では、ADF 法の Feast 期後に PHA 蓄積細胞の重力沈降ステップを加えて改良した Aerobic Dynamic Discharge (ADD) 法に着目し、ADF 法と ADD 法による PHA 蓄積菌の集積効果を比較検討した。12 時間を 1 サイクルとして 6.5 日間の集積を行い、得られた集積系の PHA 蓄積能を評価するとともに、集積された微生物群集を解析した。

(3) 有機物組成の異なる汚泥のメタン生成ポテンシャルの評価

様々な下水二次処理方式（標準活性汚泥法、無酸素好気法、嫌気無酸素好気法、回分式活性汚泥法、オキシデーションディッチ法、膜分離活性汚泥法）から下水汚泥を採取し、有機成分、無機成分（金属）の含有量を調査するとともに、回分式の嫌気性消化試験（37℃）に供し、嫌気性消化特性を調査した。

4. 研究成果

(1) *Rhodocyclaceae* 科細菌の汚泥中における分布及び PHA 蓄積特性

下水汚泥中の *Rhodocyclaceae* 科細菌の存在割合を調査した結果、細菌群集全体の最大でも 3%程度であり、下水汚泥中での存在割合は必ずしも多い訳ではないことが確認された。

また、*Azoarcus* 属の 3 菌株、*Thauera* 属の 4 菌株、*Zoogloea* 属の 3 菌株を対象として、PHA 合成に必須の *phaC* 遺伝子の有無を調べたところ、すべての菌株がクラス I/II の *phaC* 遺伝子を保有することが確認された。この結果から、これらの属が遺伝的には共通して PHA 蓄積能を有することが明らかとなった。

次に、試験菌株の増殖能に基づいて 6 菌株を選抜し、事前検討において増殖に有効であることが確認された炭素源（酪酸、乳酸、プロピオン酸、ピルビン酸、コハク酸の中から菌株ごとに 3-4 種）を基質に用い、PHA 蓄積能を調査した。その結果、*Azoarcus* 属は酪酸、*Thauera* 属はピルビン酸、*Zoogloea* 属は乳酸において良好な PHA 蓄積が見られた。PHA 蓄積率では *Zoogloea* 属細菌が優れており、乳酸あるいはピルビン酸を炭素源として、6 時間で 60%を上回る PHA 蓄積率に達した。また、化学的酸素要求量（COD）消費量あたりの収率では、*Azoarcus* 属は酪酸、*Thauera* 属と *Zoogloea* 属では乳酸、3 属共通でピルビン酸が優れていることが明らかとなった（図 1）。

さらに、*T. butanivorans* NBRC 103042 と *Z. resiniphila* JCM 21744 によるピルビン酸からの PHA 蓄積を対象として、培養温度及び窒素・リン添加量（炭素源に対する添加比率）による影響について検討した。その結果、いずれの菌株でも、20℃及び 37℃に比べて 28℃で PHA 蓄積能が高くなった。また、窒素とリンの少なくともいずれかを制限した場合に高い PHA 蓄積率を示したことから、他の PHA 蓄積菌でも報告されているように、*Rhodocyclaceae* 科細菌による PHA 蓄積も栄養塩欠乏のストレス条件下において誘導されることが示唆された。

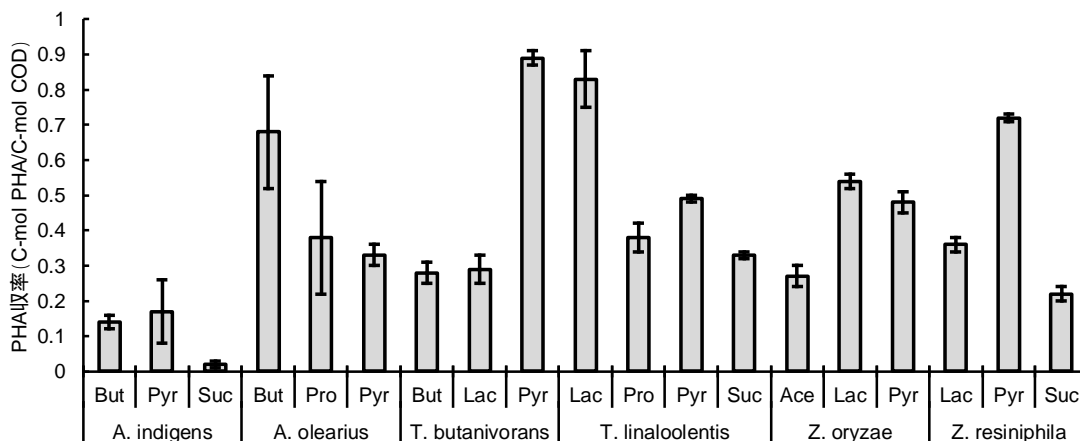


図 1. *Azoarcus* 属、*Thauera* 属、*Zoogloea* 属の代表菌株による様々な炭素源からの PHA 収率
Ace, 酢酸; But, 酪酸; Lac, 乳酸; Pro, プロピオン酸; Pyr, ピルビン酸; Suc, コハク酸

(2) 下水汚泥の直接 PHA 高含量化の可能性

集積なしでの PHA 高含量化の可能性を明らかにするため、3 種類の炭素源添加方法（回分方式、炭素源の事前添加あり/なしでのフェドバッチ方式）を用いて下水汚泥による PHA 蓄積を試みた。その結果、48 時間まで培養を継続すると、はじめに一度だけ炭素源を添加する回分方式において PHA 蓄積率が約 46%に達した（図 2）。一方、フェドバッチ方式では、6 時間後までは回分方式と同程度の PHA 蓄積率を示したが、予想に反し、その後の増加が緩やかであり、24 時間以降には PHA 蓄積率の増加は観察されなくなった。以上の結果から、下水汚泥から直接 PHA を高蓄積させる方法としては、検討した方法の中では回分方式が最も有効であることが示唆された。

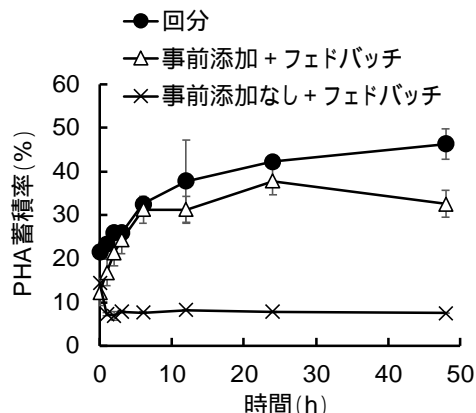


図 2 異なる炭素源添加方法による下水汚泥の PHA 蓄積の比較

(3) PHA 蓄積菌の迅速集積法の確立

ADF 法及び ADD 法を用いて、6.5 日間での PHA 蓄積菌の集積を試みた。汚泥濃度と Feast/famine 比（炭素源消費速度の指標）のモニタリングの結果、いずれの方法でも、集積期間中に微生物群集がある程度安定化することが確認された。また、terminal restriction fragment length polymorphism 法を用いて細菌群集の遷移をモニタリングした結果、特定の微生物種が優占化することが観察され、特に ADD 法においては優占化が早期に進行し、ADF 法よりも短期間で安定した集積系が構築されることが示唆された。そこで、種汚泥と ADF 法及び ADD 法による集積系の PHA 蓄積能を評価した。炭素源を事前に添加する回分方法で検討したところ、PHA 蓄積能は ADD 法の集積系で最も高く、12 時間で 47% 程度の PHA 蓄積率に達した（図 3）。また、PHA 収率でも ADD 法の集積系は ADF 法の集積系よりも優れることが確認された。以上の結果から、ADD 法は数日レベルの短期間で PHA 蓄積菌を高度に集積する上で有望な方法であると考えられ、集積及びその後の PHA 蓄積に係る条件の最適化により、PHA 高含量化汚泥の短期生産に資すると考えられた。

集積系の微生物叢解析を行った結果、両集積方法によって *Rhodocyclaceae* 科細菌の存在割合が大幅に増加し、特に *Zoogloea* 属と *Dechloromonas* 属が優占化することが確認された。また、ADF 法と ADD 法を比較すると、ADD 法では ADF 法よりも *Rhodocyclaceae* 科細菌の存在割合が高かった。以上の微生物叢解析結果と上述した PHA 蓄積能から、*Rhodocyclaceae* 科が下水汚泥の PHA 高含量化にとって重要であることが改めて示唆された。また、ADF 法と ADD 法はともに *Rhodocyclaceae* 科細菌を集積して PHA 蓄積能を向上できるが、ADD 法がより有効であることが明らかとなった。

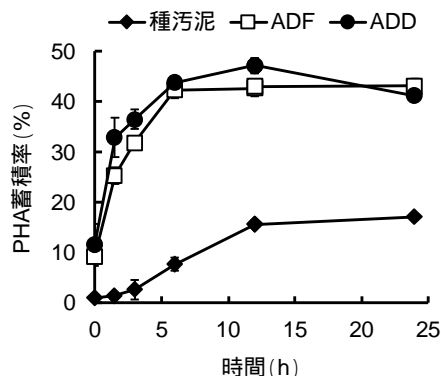


図 3 ADF 法及び ADD 法で構築した集積系の PHA 蓄積能

(4) 下水汚泥中の有機物組成とメタン生成ポテンシャルの関係

試験に用いた下水汚泥の有機物組成では、タンパク質が最も多く（強熱減量（VS）の 41.5%-60.9%）、次いで糖類（15.5%-19.4%）、フミン質（7.5%-26.0%）が多く、PHA 含量は VS あたりで 2% に満たなかった。また、無機成分では、鉄及びアルミニウムの含有量の幅が広く、下水処理場における鉄系あるいはアルミニウム系凝集剤の使用状況が下水汚泥の鉄・アルミニウム含有量に影響したものと示唆された。

これらの下水汚泥を用いた嫌気性消化試験の結果、実験終了時（30 日）までの VS 分解率は 32%~42% であった。また、汚泥によらず初期（3-5 日）に大幅に減少し、それ以降に緩やかに減少する傾向を示したことから、易分解性成分→難分解性成分の順に分解されたものと示唆された。メタン発生も同様に 2 段階で上昇する傾向が観察され、後半の緩やかなメタン発生は汚泥によらず同程度であったことから、初期の易分解性成分に由来するメタン発生が最終的なメタン生成量の決定要因であると示唆された。メタン転換率を算出したところ、148-247 L-CH₄/kg-投入 VS となり、オキシデーショディッチ法と膜分離活性汚泥法においては他の処理方式に比べて明らかに低かった。また、汚泥の有機・無機成分とメタン転換率との関係を調査したが、PHA 含量との関連性は見られなかった。既往研究では PHA 含量 3-38% の汚泥を用いることで PHA 含量とメタン転換率に相関関係が見出されているが、本研究で用いた汚泥では PHA 含量が全体的に低く、かつ、汚泥間での差異が小さかったため、PHA の易分解性に起因するメタン転換率の向上効果はわずかしかなく、PHA 含量とメタン転換率の間に明確な相関関係が見られなかったものといえる。他方、アルミニウム含有率がメタン転換率と負の相関を有することが示され、アルミニウム系凝集剤の使用が下水汚泥のメタン転換率の低下につながる可能性のあることが示唆された。

< 引用文献 >

- 李玉友, 小林拓朗. (2015) 世界の嫌気性消化とバイオメタンの新技術の研究開発と実用化. 水環境学会誌, 38, 273-278
- S. M. Shamsul Huda, Hiroyasu Satoh, Takashi Mino. (2013) Anaerobic digestion of polyhydroxyalkanoate accumulated in excess activated sludge. Journal of Water and Environment Technology, 11, 429-438
- Satoshi Soda, Koichi Iwama, Kazunori Yokoe, Yukihiro Okada, Michihiko Ike. (2016) High methane production potential of activated sludge accumulating polyhydroxyalkanoates in anaerobic digestion. Biochemical Engineering Journal, 114, 283-287

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- Daisuke Inoue, Yuta Suzuki, Kazuko Sawada, Kazunari Sei. (2018) Polyhydroxyalkanoate accumulation ability and associated microbial community in activated sludge-derived

acetate-fed microbial cultures enriched under different temperature and pH conditions. Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, 125, 339-345

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.09.008

Daisuke Inoue, Yuta Suzuki, Jota Morohoshi, Kazunari Sei. (2017) Polyhydroxybutyrate accumulation ability and relevant microbial populations in acetate-fed mixed microbial cultures enriched from activated sludge under different temperature conditions. Japanese Journal of Water Treatment Biology, 査読有, 53, 57-67

DOI: 10.2521/jswtb.53.57

[学会発表](計14件)

井上大介, 福山篤史, 池道彦. (2019) 余剰汚泥中のポリヒドロキシアルカン酸蓄積微生物の迅速集積に関する基礎的検討. 第53回日本水環境学会年会

大津留知樹, 古川隼士, 清和成, 井上大介. (2019) *Zoogloaceae* 科細菌のポリヒドロキシアルカン酸蓄積能に及ぼす環境因子の影響. 第53回日本水環境学会年会

井上大介, 成井貴祥, 黒田真史, 惣田訓, 池道彦. (2018) 二次処理方式に着目した下水処理場におけるメタン生成ポテンシャルの評価. 第29回廃棄物資源循環学会研究発表会

大津留知樹, 古川隼士, 井上大介, 清和成. (2018) *Zoogloaceae* 科細菌のポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 蓄積能に及ぼす炭素源の影響. 第7回ファージ研究会・2018年日本細菌学会関東支部インターラボセミナー合同大会

Daisuke Inoue, Takaaki Narui, Yukihiro Okada, Kazunori Yokoe, Masashi Kuroda, Satoshi Soda, Michihiko Ike. (2018) Potential of PHA and glycogen accumulation from industrial wastewater in waste activated sludge. Grand Renewable Energy 2018

成井貴祥, 井上大介, 黒田真史, 惣田訓, 池道彦. (2018) 下水二次処理方式が余剰汚泥のメタン回収ポテンシャルに及ぼす影響の評価. 第52回日本水環境学会年会

大津留知樹, 古川隼士, 井上大介, 清和成. (2018) *Rhodocyclaceae* 科細菌のポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 蓄積能の評価. 第52回日本水環境学会年会

井上大介, 酒井孝輔, 三宅佐和, 惣田訓, 池道彦. (2017) 酢酸を基質として活性汚泥より集積した微生物群の PHB 蓄積能に対する Feast 期の影響. 日本水処理生物学会第54回大会

Daisuke Inoue, Kousuke Sakai, Sawa Miyake, Satoshi Soda, Michihiko Ike. (2017) The 2nd International Resource Recovery Conference

Tomoki Otsuru, Daisuke Inoue, Kazunari Sei. (2017) Polyhydroxyalkanoate accumulation abilities of *Azoarcus*, *Thauera* and *Zoogloea* strains. 10th Advanced Engineering Technology for Environment and Energy -Environment, Energy and Sustainable Development

Takaaki Narui, Yukihiro Okada, Kazunori Yokoe, Masashi Kuroda, Daisuke Inoue, Satoshi Soda, Michihiko Ike. (2017) Potential of waste activated sludge to accumulate intracellular polymeric substances from simple substrates and industrial wastewater. 10th Advanced Engineering Technology for Environment and Energy -Environment, Energy and Sustainable Development

Daisuke Inoue, Tomoki Otsuru, Kazunari Sei. (2017) Polyhydroxyalkanoate accumulation abilities of *Thauera* and *Zoogloea* strains. Water and Environment Technology Conference 2017

井上大介, 鈴木悠太, 澤田和子, 清和成. (2017) 異なる pH・温度条件で活性汚泥から集積した PHA 蓄積微生物群集の特徴づけ. 第51回日本水環境学会年会

Daisuke Inoue, Yuta Suzuki, Kazuko Sawada, Kazunari Sei. (2016) Influence of temperature and pH during enrichment process on polyhydroxyalkanoate accumulation ability and associated microbial community of acetate-fed enrichment cultures derived from activated sludge. The 9th Annual Conference of the Challenges in Environmental Science and Engineering

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 池 道彦

ローマ字氏名: (IKE, Michihiko)

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 工学研究科

職名: 教授

研究者番号 (8桁): 40222856

研究分担者氏名：黒田 真史
ローマ字氏名：(KURODA, Masashi)
所属研究機関名：大阪大学
部局名：工学研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：20511786

研究分担者氏名：清 和成
ローマ字氏名：(SEI, Kazunari)
所属研究機関名：北里大学
部局名：医療衛生学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：80324177

研究分担者氏名：澤田 和子
ローマ字氏名：(SAWADA, Kazuko)
所属研究機関名：北里大学
部局名：医療衛生学部
職名：特別研究員
研究者番号(8桁)：00772485