

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23656331

研究課題名（和文）

好塩性ポリリン蓄積細菌保持バイオリアクターによるリン資源回収と富栄養化防止

研究課題名（英文）

Phosphate recovery and protection of eutrophication by bioreactor retaining halophilic polyphosphate accumulating bacteria

研究代表者

大橋 晶良 (Ohashi Akiyoshi)

広島大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70169035

研究成果の概要（和文）：

本研究は、排水処理で適用されている生物学的リン除去の原理を応用して、海水から希薄ながらも多量に存在するリンを資源として回収するための生物学的リン高濃度化技術の開発を目的とし、模擬海水を用いた DHS リアクターによるリン回収実験を行った。その結果、嫌気 3 時間、好気 9 時間の 12 時間サイクルがポリリン蓄積細菌の集積に適していて、 $100\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上に濃縮できることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this study is to develop a new biotechnology to condense low phosphate concentration solutions for phosphate recovery from seawater containing very great abundance of phosphate, based on the principle of biological phosphate removal applied to wastewater treatments. A phosphate recovery experiment was conducted using a DHS reactor with a synthetic seawater. The results show that 12 hour cycle of 3 hour anaerobic and 9 hour aerobic conditions is most appropriate to dominate polyphosphate accumulating bacteria, and demonstrated that the new technology would concentrate seawater to more than $100\text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：環境保全

1. 研究開始当初の背景

リンは近代農業に欠かせない化学肥料の原料であり、現在の食料生産を続けて行く上で必要不可欠な物質である。枯渇資源であるリン鉱石は近年の新興国での農産物需要の拡大に加え、資源確保のために中国やアメリカが輸出制限を行ったため、世界的に受給が逼迫している。日本はリンを 100% 輸入に頼

っている事から早急な対策が必要である。そのため、排水処理においても富栄養化防止の観点だけではなく資源として回収利用するため、排水中からのリン回収・資源化の研究が進められている。しかしながら、処理回収コストの高さなどから資源としてはまだあまり利用されていないのが現状である。

一方、下水からリンを漏れなく回収しても、

その回収量は輸入リン量の約 15% 相当しかない。国内で使用されたリンの残り 85% は一部土壌に保持され、多くは海へ流出している。従って、今後リンを持続的に利用するためには、海水中の希薄なリンを回収する必要に迫られる。

ここ数年、リンの価格は高騰しており、今後も上昇すると予想されている。すなわち、低コスト型のリン回収技術が創出されれば、商業ベースにのったリン回収は現実性を帯びており、海水・汽水からリン資源を回収することの意義は大きく、決して夢物語ではない。

2. 研究の目的

これまでに従来の活性汚泥法に代わる、余剰汚泥発生ゼロ、エアレーションを要しない好気性の DHS (Downflow Hanging Sponge) リアクター (特開平 10-263578) を開発し、排水処理の研究を行ってきた。その結果、実下水や産業排水に対して、DHS リアクターは活性汚泥法と同等の良好な処理が可能であることが明らかになってきており、インドで下水処理プラントの計画が進められている。ただし、DHS リアクターは余剰汚泥が発生せず、このため汚泥の引き抜きがないため、下水中のリンはリアクター内を素通りし、全くリン除去ができない栄養塩除去に対しては不向きな処理装置である。ところが、DHS リアクターは嫌気と好気状態のサイクルを施すことで生物学的に下水中のリンを除去し、濃縮して回収することが可能であることを発見した (特願 2007-15549, リン回収方法及び装置)。NEDO のプロジェクトで DHS プラントを下水処理場に設置して、実下水からリン回収の実証試験を実施している。このシステムを利用すれば、従来の余剰汚泥からリンを取り出す方法とは異なるため、海水や汽水からでもリンが濃縮回収できるのではないかと考えた。

そこで、排水処理で適用されている生物学的リン除去の原理を応用して、海水から希薄ながらも多量に存在するリンを富栄養化防止の観点だけではなく、資源として回収するための生物学的リン高濃度化技術開発が本研究の目的である。具体的には、未知な海水に生息する好塩性のポリリン蓄積細菌の存在と動態を明らかにし、増殖とリンの摂取・放出に適した環境条件を見出す。また、この微生物を新規の DHS バイオリアクター内に高濃度に保持させ、約 $0.02\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ の海水を約 5000 倍に濃縮した $100\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度の高濃度リン含有液として回収できることを実証する。

3. 研究の方法

(1) 新規リン高濃度化の原理

本研究における溶液中のリンの回収は、従来の下水処理で行われている生物学的嫌気・好気法の原理を用いるが、汚泥を引き抜くことなく、高濃度のリン含有液としてリアクターから回収する。

散水ろ床法の一つである DHS リアクター内のスポンジ担体にポリリン酸蓄積細菌 (PAOs) を高濃度に生息させて、好気環境下でリン含有排水を上部から散水すると、PAOs によってリンが摂取されて、リン除去された処理水が下部から排出される。除去されたリンは、ポリリン酸として PAOs に蓄積される。次に有機物含有の排水でリアクターを満たしてスポンジ担体を浸漬させ、嫌気状態にして放置しておくこと、PAOs は有機物を取り込みながら蓄えていたポリリン酸をリン酸塩として排水中に放出し、高濃度のリン含有液が作られ、この排水を回収する。この好気と嫌気の状態を繰り返せば、継続的にリン含有排水は高濃度化される。人工排水を用いた実験結果で、低濃度のリン含有液 ($5\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$) を 30 倍 ($150\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$) 以上に濃縮回収できることを確認している。

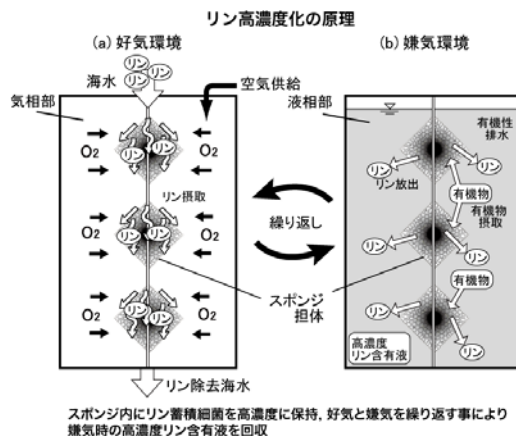


図1 リン回収の原理

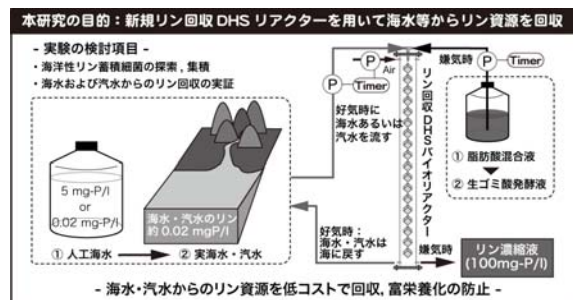


図2 海水からのリン回収システム

(2) 研究方針

本研究グループが開発した密閉型 DHS リアクターによる下水処理水中からのリン高濃度化の手法を海水に適用すれば、 $100\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上のリン濃縮液の回収は原理的に実現可

能である。しかし、海水からの生物学的リン回収の試みは世界でもまったく行われておらず、未知の好塩性ポリリン蓄積細菌 (PAOs) の至適な生育条件は不明な状況である。従って本研究は次の課題を順次行った。

(3) 好塩性のポリリン蓄積細菌 (PAOs) の探索・同定

模擬海水を用いた DHS リアクターからのリン回収実験において、ポリリン酸の蓄積と放出を行う微生物が集積され、これは海洋性の PAOs で γ -Proteobacteria の Uncultured クラスターに属すると考えられるが、確証までには至っていない。リンの高濃度化による回収の鍵は、好塩性の PAOs を如何にリアクター内に高濃度に保持させるかにかかっており、そのためには好塩性の PAOs のモニタリングは不可欠である。従って、好塩性の PAOs の同定を行った。

(4) DHS リアクターの至適なリン回収運転条件

模擬海水に $5\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ のリンを添加して、簡易な DHS リアクターによる嫌気 4 時間、好気 8 時間の 12 時間サイクル運転によるリン回収実験では、 $80\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度の回収液に止まっている。これは、高さがわずか 30cm と低い簡易な DHS リアクターを使用したために、好気環境下でもスポンジ担体内への溶存酸素の供給が遅くて、内部は好気状態になっていなかったことが予想され、また嫌気・好気の時間が適切でなかったこと等が考えられる。そこで本研究では、実装置を想定した高さ 1m の DHS リアクターを用い、嫌気・好気時間サイクルで運転を行い、PAOs が優占化して $100\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上のリン濃縮液の回収が可能な運転条件を探る。なお、嫌気条件下では有機物の添加が必要であり、人工の有機酸混合液 (酢酸とプロピオン酸, $300\text{mgCOD}\cdot\text{l}^{-1}$) を用いた。

(5) 低濃度のリン摂取

上記 (4) の実験においてリン回収が実証されても、実海水に必ずしも上手く適用できるとは限らない。実海水のリン濃度は $0.02\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度と、実証実験②の $5\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ よりもかなり低濃度である。このため、海水を適用した場合、PAO 微生物のリン濃度に対する親和性が低ければ、リン摂取速度が遅くなるのが懸念される。これまでの実験では、濃度 $5\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ のリン含有水は HRT20 分でリンはほぼ完全に摂取除去される。ただし、リン負荷に対する処理能力が多少下がったとしても、低濃度のリン含有水の処理では HRT は濃度に反比例して小さくなるため、例えば $0.05\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ の海水では好気条件下の理論的 (リン濃度の親和性に影響がない場合) な

HRT は 0.2 分 (12 秒) と途轍もなく高速な処理である。

この PAOs のリン親和性に関する研究はほとんど見あたらず、これを調べるために、同様のリアクターを用いて、連続リン回収実験を行った。ただしリンは添加せず、低濃度リン含有人工排水を用いた。また、この実験で集積される汚泥について分子生物学的手法を用いて群集構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 好塩性のポリリン蓄積細菌

模擬海水を用いた DHS リアクターからのリン回収実験において、Phase 1 の嫌気基質の有機物を酢酸ナトリウムのみの場合、リンの取り込み、放出の現象は見られなかった。そこで、運転 68 日目に有機物を酢酸ナトリウムとプロピオン酸ナトリウムに変更したところ、100 日目ころからリンの摂取・放出を確認できるようになり、135 日目には定常状態となった。高濃度塩分環境下においてもリンの摂取・放出を行う好塩性のポリリン蓄積細菌が存在することが確認された。有機物の利用特性を確認するために運転 209 日目から有機物を酢酸のみに戻したところ、引き続きリンの摂取・放出が起こった。

この好塩性のポリリン蓄積細菌を同定する目的で運転 199 日目にスポンジ担体からバイオマスを採取してクローン解析を行ったところ、全 53 クローン中、 α -proteobacteria 亜門の *Rhodospirillaceae* 科 (13 クローン: 25%), β -proteobacteria 亜門の *Rhodocyclaceae* 科 (16 クローン: 30%) の 2 種類の微生物群が優占化していた。検出された *Rhodocyclaceae* 科に近縁なクローンは実際の EBPR プロセスで頻繁に検出される PAOs である *Candidatus Accumulibacter phosphatis* と相同性が 98% であった。また、実際に *Accumulibacter* に特異的なプローブ (PAOmix probe) を用いて FISH 法、DAPI 染色を行い、2-3 割が PAOs であり、ポリリン酸を蓄積していることを確認した。すなわち Phase 2 ではこの菌がリンの摂取・放出を行っていると考えられる。また、*Rhodospirillaceae* 科に近縁なクローンは PAOs の競合細菌のグリコーゲン蓄積細菌 (GAOs) と近縁であった。既往の淡水性 GAOs (Defluviicoccus related-GAO) と比較した結果、相同性は 96% であり新種の GAOs であると考えられる。

一方、Phase 3 では *Accumulibacter* がほとんど存在しておらず、Phase 2 ではほとんど見られなかった糸状性細菌が 3 割程度存在し、ポリリン酸を蓄積していることが確認された。この糸状性細菌は *Actinobacteria* 門の *Nostocoidia limicola* と呼ばれる PAOs の一種で、EBPR プロセス内でその存在はすでに

確認されているが、どのような条件で優占化するかについてはほとんど情報が無い。通常、淡水環境下では、プロピオン酸存在下や酢酸のみで培養した場合でも *Accumulibacter* が優占化する。しかしながら、基質を酢酸のみに変更した結果 *Accumulibacter* は減少し、*Nostocoidia limicola* がリンの摂取・放出を担うようになったと思われる。この結果から、高濃度塩分環境下では *Accumulibacter* の基質利用特性が変化すること、また優占化する PAOs は変化することが示唆された。

培養できた PAOs が淡水環境下でもリンの摂取・放出を行うことができるのかを確認するために、運転 286 日目に淡水に変更して運転を行った。その結果、リンの摂取・放出は徐々に低下し、活性が見られなくなった。運転 293 日目に再び海水に変更したが、回復しなかった。これらのことから、この糸状性細菌は酢酸のみの淡水下では生息できない高濃度塩分環境下で酢酸を資化する PAO であることが示唆された。

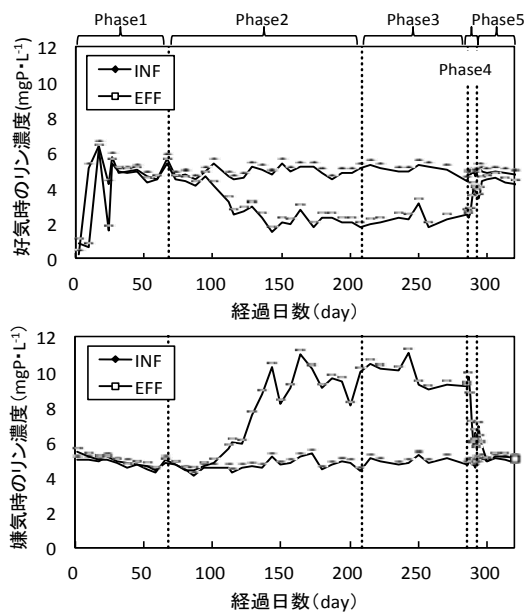


図3 模擬海水によるリン回収性能

(2) 至適なリン回収運転

上述したように模擬海水を用いた DHS リアクターによるリン回収実験において、ポリリン酸の蓄積と放出を行う好塩性のポリリン蓄積細菌を集積することに成功した。ポリリン蓄積細菌は嫌気時間と好気時間のサイクルは、リンの摂取・放出量に大きく影響を及ぼし、嫌気 3 時間、好気 9 時間の 12 時間サイクルがポリリン蓄積細菌の集積に適していた。

(3) 低濃度リン溶液からの回収

ppk 1 遺伝子はポリリン酸を細胞内で構築

する酵素をコードしている遺伝子で、EBPR 内から様々な ppk 1 遺伝子が回収されている。また、それぞれ固有の表現型がある事が確認されており、形状の違いや脱窒能力の有無が報告されている。しかしながら、これらの知見は部分的な見解で、どのような環境でどの種類の *Accumulibacter* が優占化するのかわかりません。本研究では様々なリン濃度で *Accumulibacter* を培養し、ppk 1 遺伝子に基づいた系統解析を行い、どのような多様性を有するようになるのか調査した。

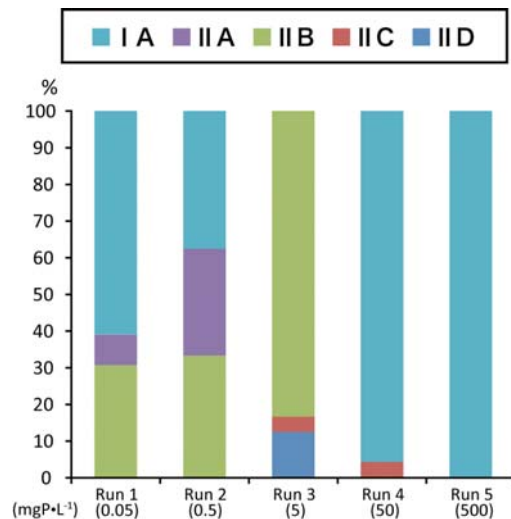


図4 ppk 1 遺伝子の割合

培養の結果、1 ヶ月経過頃からリン除去、放出が確認されるようになり、運転 84 日目には Run2-5 において供給した有機物がほとんど除去されていた。同時にリンの放出も徐々に確認されるようになり、Run 1 以外の条件では最終的にリンの放出が確認されるようになった。

運転 85 日目に培養したリアクターからバイオフィームを採取、DNA を抽出し ppk 遺伝子に特異的なプライマーセット (ACCppk254f-ACCppk1376r) を用いて PCR 増幅を行い、各 24 クローンずつ解析を行った。得られた ppk 1 遺伝子の系統樹を作成した。またバイオマスの FISH 法による顕微鏡観察結果から微生物群の構成比を算出した (使用したプローブは PAOmix probe, GAOmix probe, DF1mix probe, DF2mix probe と EUBmix probe)。

回収された ppk 遺伝子のシーケンスは既往の研究の結果にすべて近縁であり、5 種類に分類する事ができた。Run 3 では IIB, Run 4, 5 では IA が多数検出された。一方、Run 1, Run 2 では IA, IIA, IIB の 3 種類が検出された。顕微鏡観察においても、Run 4 で検出された菌群は 1 μm の桿菌であったのに対して、Run 3 で検出された菌群は 2-3 μ

mの球菌が多く、菌の種類が明らかに異なっていた。リン親和性と検出された菌種でまとめると、リン濃度が $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上でIAが、 $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下ではtype IIが検出される傾向が確認された。ラボスケールのEBPRではType Iが検出され、下水処理場ではType IIのみしか確認されずType Iはほとんど確認されない傾向にある事が報告されている。下水処理場ではリン除去が完全に達成されるまで行っており、好気槽のHRTを十分に長くとってPAOsは低濃度リン環境に長く晒されている。一方、ラボスケールでは嫌気好気の切り替わりが短く低濃度リン環境がほとんどない。この差がこれまでの傾向に現れたのではないかと考えられる。

実際の海水のリン濃度は $0.02 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 程度である。好気性条件下でのリン取り込み速度はリン濃度によって強く影響され、上述のようにリン濃度が低くなるとリン取り込み速度が遅くなった。 $5 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ の人工海水では $100 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上の高濃度リン含有液として回収することができたが、リン濃度 $0.02 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 程度では、高濃度化できるものの $100 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上に濃縮することは困難であると推測された。しかし、生物学的リン高濃度化システムを2系列設ければ、 $100 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上に濃縮できることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

- ① 小寺博也, 大橋晶良ら「ポリリン酸蓄積細菌の多様性」、第46回日本水環境学会年会、2012.3.14-16、東京都(東洋大学)
- ② 間口暢之, 大橋晶良ら「DHSリアクターを用いた海洋性ポリリン酸蓄積細菌の集積培養」、第46回日本水環境学会年会、2012.3.14-16、東京都(東洋大学)
- ③ 間口暢之, 大橋晶良ら「高濃度塩分環境下に生息するポリリン酸蓄積細菌の集積培養」、第63回土木学会中国支部研究発表会、2011.5.21、岡山市(岡山大学)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 晶良 (Ohashi Akiyoshi)
広島大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 70169035

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし