

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630246

研究課題名(和文)耐塩性(好塩性)のポリリン酸蓄積細菌は新種? 海水・汽水からの生物学的リン回収

研究課題名(英文) Polyphosphate accumulating bacteria are salt-tolerant? Biological phosphate recovery from seawater and brackish water

研究代表者

大橋 晶良(OHASHI, AKIYOSHI)

広島大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70169035

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): ポリリン酸蓄積細菌(PAOs)は塩濃度により多様性があり, ppk遺伝子と16S rRNA遺伝子に基づいた微生物の系統解析により, PAOsのクレードと好適な生息環境を明らかにした。DHSリアクターに多様なPAOsを集積培養することに成功し, 海水のみならず汽水からリン濃縮液としてリンを回収できることが分かった。

研究成果の概要(英文): This study revealed the relationship between the clades of polyphosphate accumulating bacteria (PAOs), which are rich in diversity depending on salinity, and favorable environment conditions of the respective clades. The diverse PAOs were successfully cultivated by a DHS reactor under different salinity conditions, suggesting that it is possible to recover polyphosphate as concentrated solution from not only wastewaters but also seawater and brackish water.

研究分野: 環境衛生工学

キーワード: リン 資源回収 ポリリン酸蓄積細菌 海水・淡水 バイオリアクター

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、世界的に供給が逼迫している。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性に迫られる。

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

申請者のグループは、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た。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。

ポリリン酸蓄積細菌 (以下 PAOs) は生物学的リン除去 (EBPR) プロセスの要となる存在であり、下水からリンを蓄積する能力を持つ微生物として知られている。しかしながら、活性汚泥から培養された PAOs は耐塩性を有しておらず、高塩分含有排水のリン除去には適用できないという報告が数多く存在する (Bassin et al. 2011)。一方で、海洋の底泥からは PAOs 特有のポリリン酸キナーゼ (ppk1) 遺伝子が回収されている (Peterson et al. 2008)。これまで干潟底泥を植種源として、嫌気好気条件を繰り返す DHS リアクターを用い、高塩分環境下における PAOs の集積培養に成功している (小寺ら 2013)。これに対し微生物解析を行った結果、淡水 EBPR プロセスにおいてリン除去を担う主要な微生物である *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* (*Accumulibacter*) と非常に近縁な種である事が分かった。自然環境からは様々な *Accumulibacter* グループの ppk1 遺伝子が回収されており、大きくは Type I と Type

に大分され、そこから更に細かく分類される。これまでに脱窒能力の有無といった表現型の違いが報告されているが、各グループの機能については未解明であった (McMahon et al. 2007)。そこで、本研究で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、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、海水および淡水から高濃度リン含有液として回収できることを実証する。具体的には活性汚泥と干潟底泥を植種源として PAOs の培養を行い、リンの摂取・放出能力を調査した。その後、微生物解析により淡水・海水・汽水環境に生息する PAOs の分類を明らかにした。

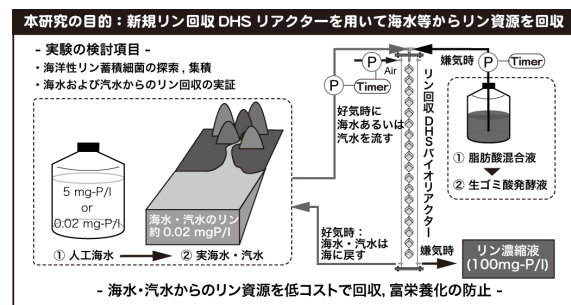


図1 海水からのリン回収システム

3. 研究の方法

(1) 新規リン高濃度化の原理 (特願2007-15549、リン回収方法及び装置)

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、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。この好気と嫌気環境を繰り返せば、継続的にリン含有排水は高濃度化される。

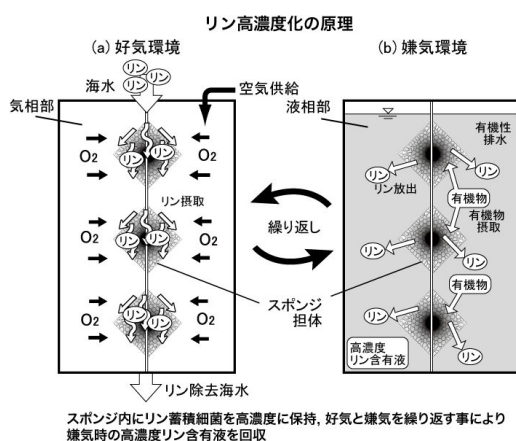


図2 リン回収の原理

(2) 研究方法

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、海水等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 (塩耐性) ポリリン酸蓄積細菌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解決していく。

- i) 活性汚泥および干潟底泥を植種源として、淡水、海水、汽水の条件でポリリン酸蓄積細菌を DHS リアクターにて集積培養する。
- ii) 培養したリアクターに条件を変えて、リンの取込み、放出性能を調べる。
- iii) 集積された微生物群集を解析して、ポリリン酸蓄積細菌の Clade を明らかにする。

(3) 実験方法

内径 5 cm、高さ 15 cm の円筒形の容器 (0.3 L) に 2 cm 角のスポンジ担体 5 個 (全容積 40 cm³) を吊るした DHS リアクターを用いて培養した。嫌気 3 時間、好気 9 時間の 12 時間サイクルの運転を 20 の恒温室で行った。好気嫌気基質共にリン濃度 $5\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ 、アンモニア性窒素 $1\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ とした。さらに嫌気基質には $\text{C}_2\text{H}_5\text{COONa}$ と CH_3COONa を 100

$\text{mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$ ずつ添加した。

培養は活性汚泥と干潟底泥の 2 種類の植種源でそれぞれ 4 つの実験条件 (Run-1 好気: 海水・嫌気: 海水, Run-2 好気: 淡水・嫌気: 淡水, Run-3 好気: 淡水・嫌気: 海水, Run-4 好気: 海水・嫌気: 淡水) の計 8 系列リアクターを運転した (表 1)。実験条件として植種源の違いにより活性汚泥は (活性 Run-1 から活性 Run-4)、干潟底泥は (干潟 Run-1 から干潟 Run-4) と呼ぶ。淡水基質には下水模擬水を、海水基質には人工海水 (マリンテック社製) $35\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (塩分濃度 3.5%) を加えた。

リン除去が定常状態に達した後、各スポンジ担体からバイオマスを回収した。PCR 増幅には *Accumulibacter* のポリリン酸合成遺伝子 (*ppk1*) をターゲットとしたプライマーセット *ppk1_254f-ppk1_1376r* を用い、精製後クローン解析を行った。顕微鏡観察 (FISH 法) には全細菌群を対象とした EUBmix probe、*Accumulibacter* を対象とした PAOmix probe を用いた。

培養後、PAOs の環境適応性を評価するため、定常状態に到達して一部バイオマスを回収した後、海水・淡水基質条件をそれぞれ交換し、リン摂取・放出能力の変化を調べた。

表 1 実験条件及び条件切り替え結果

	活性Run-1	活性Run-2	活性Run-3	活性Run-4	干潟Run-1	干潟Run-2	干潟Run-3	干潟Run-4
切り替え前	海水/海水	淡水/淡水	淡水/海水	海水/淡水	海水/海水	淡水/淡水	淡水/海水	海水/海水
切り替え後	淡水/淡水	海水/海水	海水/淡水	淡水/海水	淡水/淡水	海水/海水	海水/淡水	海水/海水
結果	低下	低下	維持	維持	低下	維持	維持	維持

※ (↑/↓): 好気基質 / 嫌気基質

4. 研究成果

(1) 実験結果および考察

全ての培養条件において、リン除去・放出が確認されるまでにかかった時間に差が見られたものの、最終的にはリン除去反応が確認され、PAOs を培養することができた。このことは、淡水下以外にも海水などの高塩濃度下においても PAOs は生息し、しかも培養できることを示しており、世界初の報告である。FISH 観察では活性 Run-1 を除いた全ての条件で *Accumulibacter* が全細菌中約 10~30% 存在していた。活性 Run-1 からは FISH 法で観察されず、また *ppk1* 遺伝子の回収もできなかった。よって、活性 Run-1 のリアクター内には既知のプロープでは網羅できない *Accumulibacter* もしくは *Accumulibacter* 以外の PAOs が存在することを示唆している。好気、嫌気ともに淡水で培養された活性 Run-2 から Type (Type A, Type B, Type C) が多数検出された。この結果は、従来の EBPR プロセスの微生物群集と符合するものである。淡水条件から海水条件に切り替えると、リン除去能力は低下したことから Type は淡水環境のみを好むグループであると示された。この培養微生物は、植種源が干潟底泥の実験系からは全く検出されなかったことから、Type のグループは干潟底泥中には全く存在しない事が示唆された。

驚くべき事に、干潟 Run-2 では海水環境下の植種源にもかかわらず、淡水条件で *Accumulibacter* を培養する事ができた。回収されたクローンは全て Type A に属していた。さらに、培養条件が淡水から海水に変更された後も、リン除去能力を維持していた。また、汽水域のように塩分濃度が周期的に変動する条件で培養した活性 Run-3 及び干潟 Run-3 からも Type A が多数検出された。これらの結果から、Type A は淡水、海水、汽水のどの環境でも生存できる最もオールマイティなグループであることが明らかになった。

一方で、Type B は活性 Run-3、干潟 Run-3、干潟 Run-4 といった汽水条件でのみ多数検出された。これらの条件では海水基質と淡水基質を切り替えた後もリン除去能力を維持していた。この事から、Type B は汽水条件を好むグループであることが分かった。

干潟底泥を植種源とした干潟 Run-1 からは Type B、Type D と Type の中でも未知のグループ (unknown) が回収された。干潟 Run-1 を海水から淡水条件に切り替えたところ、リン除去能力が失活したため、この新種の unknown 及び Type D は海水条件のみを好み、淡水では生存できないグループであることが示された。また、活性汚泥を用いた活性 Run-1 には、海水のみで増殖する PAOs が培養されたが、これとは異なる種であった。

(2) 結論

ポリリン酸蓄積細菌 (PAOs) は塩濃度により多様性があり、ppk 遺伝子と 16S rRNA 遺伝子に基づいた微生物の系統解析により、PAOs のクレードと好適な生息環境を明らかにした。DHS リアクターに多様な PAOs を集積培養することに成功し、海水のみならず汽水からリン濃縮液としてリンを回収できることが分かった。

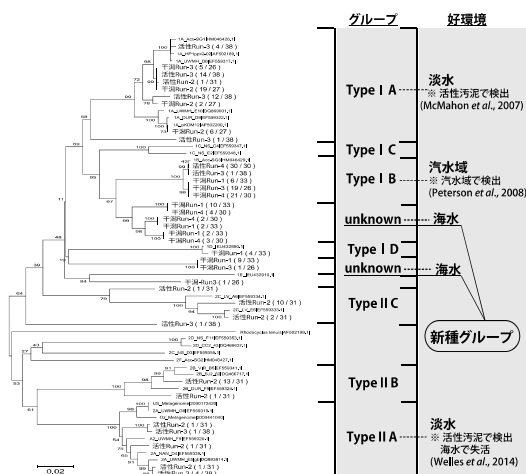


図3 ppk1 遺伝子に基づくポリリン酸蓄積細菌 (PAOs) の系統樹

(3) 展開

回収リン液が $100\text{mgP}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上であれば、MAP 法を用いて、粒状のリン晶析が生産できる。

MAP 法はマグネシウムとアンモニアが必要となるが、海水・汽水中には十分量のマグネシウムが存在している。またリンを嫌気条件下で放出させる際に有機物が必要となるが、生ゴミを酸発酵させた溶液を利用する計画である。これを用いる事によりアンモニアも同時に供給できる。さらに、海水からのリン回収は瀬戸内海などの閉鎖性水域の富栄養化防止にも寄与できる。すなわち、本研究はリン資源の回収・富栄養化の防止・生ゴミ処理と、一石三鳥の技術である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Linh Thi Thuy Cao, Hiroya Kodera, Kenichi Abe, Hiroyuki Imachi, Yoshiteru Aoi, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi.

Biological oxidation of Mn(II) coupled with nitrification for removal and recovery of minor metals by downflow hanging sponge reactor.

Water Research, Vol. 68, No. 1, pp. 545-553.

査読有、2015 January,

DOI: 10.1016/j.watres.2014.10.002

[学会発表](計5件)

1. 長井 洋亮, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良.

淡水・海水・汽水環境に生息する多様なポリリン酸蓄積細菌の分類.

第 50 回日本水環境学会年会 2016.3.16-18, アスティ徳島(徳島県徳島市)

2. 小寺 博也, 金田一 智規, 大橋 晶良. 淡水・海水・汽水域 *Accumulibacter* が好む環境は?

第 30 回日本微生物生態学会大会、2015.10.17-20、土浦亀城プラザ(茨城県土浦市)

3. 小寺 博也, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良.

基質親和性に基づいたポリリン酸蓄積細菌の多様性と競合関係.

第 49 回日本水環境学会年会、2015.3.16-18、金沢大学(石川県金沢市)

4. 長井 洋亮, 小寺 博也, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良.

ポリリン酸蓄積細菌は淡水・海水・汽水域のどの環境を好むか?

第 49 回日本水環境学会年会、2015.3.16-18、金沢大学(石川県金沢市)

5. 長井 洋亮, 小寺 博也, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良.

自然界に生存するポリリン酸蓄積細菌の多様性.

第 66 回土木学会中国支部研究発表会、2014.5.31、鳥取大学(鳥取県鳥取市)

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