

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06352

研究課題名（和文）生物学的汚水処理水を極限まで清浄化する光触媒・ダイヤモンド電極併用槽の構築

研究課題名（英文）Construction of a photocatalyst/diamond electrode combination tank that purifies biological sewage-treated water to the utmost limit

研究代表者

鈴木 智順（Suzuki, Tomonori）

東京理科大学・教養教育研究院野田キャンパス教養部・教授

研究者番号：50256666

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：光触媒とホウ素添加ダイヤモンド（BDD）電極を併用した低環境負荷な処理システムの構築を本研究の目的とした。

有機物分解率が高く、トリハロメタンであるクロロホルムの生成量が低い電流値を30 mAとした。光触媒とBDD電極を併用することで有機物分解に相乗効果が確認されたが、殺菌されない細菌の存在が確認された。殺菌耐性メカニズムはペプチドグリカンの関与も示唆された。BDD電極単独と比較して、光触媒を併用することで有効遊離塩素の生成量が10%に抑えられることが確認されたことから、本併用処理システムは環境汚染物質を生成しにくい技術となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光触媒反応は汚水処理にあまり有効ではないとの研究がこれまでは報告されていたが、本研究により、BDD電極反応を併用することで、相乗効果的に有機物を分解することが示された。また、BDD電極単独で汚水処理を行うとクロロホルムが生成されてしまうが、光触媒反応を併用することで、クロロホルムの生成が大きく抑えられることも示された。つまり、本研究により環境低負荷な汚水処理システムの構築が可能となった。本併用処理システムによって殺菌も可能であることが示されたが、完全殺菌は達成されなかった。しかし、殺菌メカニズムの一端が本研究で示唆されたことで、完全殺菌に向けた改良方策も考案できると思われる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a low environmental impact treatment system using a combination of a photocatalyst and a boron-doped diamond (BDD) electrode. The current value at which the decomposition rate of organic substances was high and the amount of chloroform, which is a trihalomethane, was low was set to 30 mA. A synergistic effect was confirmed in organic matter decomposition by using the combination of a photocatalyst and a BDD electrode, but it was confirmed that there was the presence of bacteria that could not be sterilized. It was also suggested that peptidoglycan is also involved in the bactericidal resistance mechanism. Compared to the BDD electrode alone, it was confirmed that the amount of effective free chlorine generation could be suppressed to 10% by using the combination with a photocatalyst, so it has been shown that this combined treatment system may be a technology that is less likely to generate environmental pollutants.

研究分野：微生物制御学

キーワード：光触媒 ダイヤモンド電極 汚水処理 殺菌 細菌叢解析 トリハロメタン 有効遊離塩素 低環境負荷

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 一般的な汚水浄化では、汚水中の有機物を微生物の代謝により生物学的に処理しているが、有機物や微生物が残存してしまう。現時点では、微生物を次亜塩素酸で殺菌し、そのまま放流しているため、副次的に生成されるトリハロメタンなどと共に環境への負荷が懸念されている。

(2) 研究代表者の研究室では、生物学的汚水浄化システムをラボスケールにした汚水浄化槽を運転している。そして、このラボスケール汚水浄化槽内の微生物叢解析や全有機物 (TOC) 量、アンモニア態窒素量、各種タンパク質分解酵素活性量などを用いて浄化メカニズムを解析している。人工汚水を本浄化槽に投入すると、TOC 除去率が約 90%以上の処理水が得られている。しかし、一般的な浄化槽と同様に、本浄化槽の運転条件や、微生物が成育し担持されている担体の形状などを改良しても、完全には有機物を分解することはできないため、生物学的処理とは別に、処理水中の残存有機物や微生物を完全に除去する装置の開発が重要な課題となっている。

(3) 本研究代表者は光触媒反応による有機物分解や殺菌法の開発、そして殺菌メカニズムの研究も行っている。そこで、光触媒反応によって処理水中の残存有機物と微生物を除去することができるのではないかと考え、研究に取りかかったが、なかなかこれらを除去することができなかった。その後、光触媒を研究している共同研究者と共に、boron-doped diamond (BDD)電極を用いた効率のよいオゾン生成によって汚水を浄化するシステムを開発した。この様な研究の中から、光触媒反応とオゾン反応を併用することによって、処理水中の残存有機物と微生物を除去できるのではないかと本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

光触媒・BDD 電極併用処理槽 (酸化剤生成槽) を構築して、生物学的処理水中の有機物をほぼ完全に分解除去することを本研究の目的とした。そして、この酸化剤生成槽において、処理水中の微生物を殺菌する能力の検証と、その殺菌メカニズムの解明を行うことも本研究の目的とした。本酸化剤生成槽での殺菌メカニズムが解明できれば、さらなる装置の改良や、新たな殺菌対象物への適用も可能になるものと期待される。

### 3. 研究の方法

(1) ラボスケール汚水浄化装置に人工汚水を投入して生物学的処理を行い、この処理水を実際の汚水処理場の処理水と同等の TOC 量 (約 20 mg/L) に希釈した。この生物学的処理水を酸化剤生成槽に入れて処理し、TOC および生き残った細菌叢の解析を行った。

(2) 光触媒は TMiP を使用した。TMiP とは、チタン・メッシュ基材表面にアナターゼ型  $\text{TiO}_2$  を焼き付けた光触媒フィルターである。BDD 電極はニオブを基体とし、半分が導電性 diamond でコーティングされている。BDD を電極として使用するにあたっては、BDD を陽極、Pt 線を陰極とし、その間にイオン交換膜として Nafion® perfluorinated membrane (Sigma-Aldrich) を用いた。酸化剤生成槽として 200 mL 容ビーカーを使用した。その内側に 5 cm × 10 cm の TMiP を筒状にセットし、BDD 電極を生物学的処理水に浸して、UVA を照射 (3.0 mW/cm<sup>2</sup>) した。

(3) 酸化剤生成槽の性能を向上させるための電流値を検討した。本研究では、有機物分解性能が高く、環境汚染物質が生成されにくい電流値を決定するために、TOC 減少率と環境汚染物質 (クロロホルム) の生成量で評価した。TOC は TOC-VCSN (島津製作所) を用いて測定した。クロロホルムは検知器 (ガステック) およびクロロホルム用検知管 (ガステック) を使用して測定した。

(4) 酸化剤生成槽での処理後に生き残る細菌叢の解析をメタゲノム解析と純粋分離で行った。酸化剤生成槽で 24 時間処理した処理水から遠心で菌体を回収し、その解析を行った。メタゲノム解析は propidium monoazide (PMA) を用いて行った。PMA は生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞の細胞膜は透過して、可視光下で DNA と結合し、PCR を阻害する。この特長により、生存している細胞を選択的に検出することができる。菌体懸濁液に PMAxx (Biotium, Inc.) を加え、可視光照射後、ゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的にした PCR を行った。得られたアンプリコンを MinION (Oxford Nanopore Technologies) でメタゲノム解析した。菌体を人工汚水寒天培地に接種し、30 分で培養後、純粋分離法で 3 株得た。分離株からゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的にした PCR を行い、CEQ 8800 genetic analysis system (Beckman Coulter) を用いて塩基配列を決定後、系統解析した。

(5) 生存細菌叢解析で、芽胞形成菌以外の殺菌耐性細菌はグラム陰性菌が優占していることが確認され、グラム陽性細菌の方が死滅しやすい可能性が考えられた。また、当研究室の研究成果として、「ペプチドグリカン層が厚いと光触媒殺菌されやすい」という報告もあることから、細胞壁構造の違いによって殺菌効果が異なる可能性を考え、生育するにつれて細胞壁が厚くなる *Lactiplantibacillus plantarum* JCM 1149<sup>T</sup> を供試し、殺菌メカニズムの解明を行った。

(6) 有効遊離塩素は処理水中の有機物と反応してトリハロメタンを生成する。そこで、有効遊離塩素の測定を残留塩素量測定キット-SBT 法 (同仁化学研究所) を用いて行った。

(7) BDD 電極で発生するオゾン WAK-O<sub>3</sub> や DPM-O<sub>3</sub> (KYORITSU CHEMICAL-CHECK Lab) で定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 最適な定電流条件の検討

酸化剤生成槽で生物学的処理水を処理した結果、電流値が増加するほど有機物分解率およびトリハロメタン（クロロホルム）生成量が増加する傾向が見られた。そこで、処理 24 時間でクロロホルム生成量があまり高くなり、高い有機物分解率が得られた、30 mA を最適運転電流値とした。

##### (2) 経時的な有機物分解能評価

生物学的処理水（初期 TOC 20 mg/L）を酸化剤生成槽に入れ、30 mA の定電流条件で光触媒・BDD 電極併用処理し、経時的に TOC を測定した結果を図 1 で示す。

光触媒・BDD 電極併用処理での有機物分解能を経時的に測定した結果、24 時間後に約 80% の有機物分解率を示した。これに対して BDD 電極単独処理では、約 12% の有機物分解率を示し、光触媒反応単独処理では、約 52% を示した。このことから、BDD 電極反応と比較して光触媒反応が有機物分解に大きく関与していることが示唆された。また、光触媒と BDD 電極をそれぞれ単独で使用した場合の有機物分解率の総和と比較して、光触媒と BDD 電極を併用することで、約 1.2 倍の有機物分解率を示した。

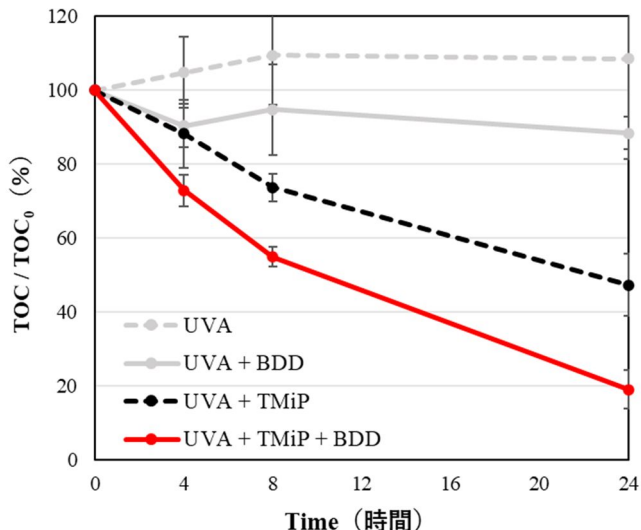


図 1. 有機物分解性能評価

##### (3) 生存細菌のメタゲノム解析

「UVA 単独処理」、「光触媒・BDD 電極併用処理」の 2 種類の処理 24 時間後に、メタゲノム解析を行った結果、466,135 リードが得られ、51% が分類可能であった。

262,839 リードが細菌にクラスタリングされ、平均配列長は 1,126 bp であった。試料の DNA 量は操作上比較することが難しいため、全体のリード数におけるそれぞれのリード数の割合から図 2, 3 の結果を得た。なお、サンプルごとの全リード数に対してリード数が 1% 以下のものは Others として一括りにした。

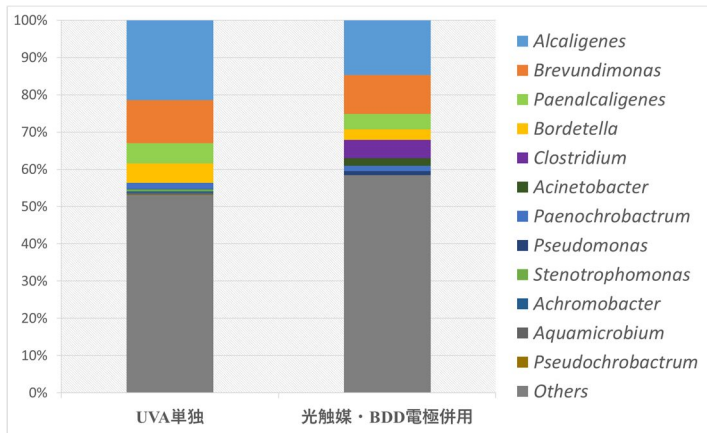


図 2. 生存細菌叢解析結果 (属レベル)

「UVA 単独処理」と「光触媒・BDD 電極併用処理」の属レベルの生存比を比較すると、*Alcaligenes*, *Brevundimonas*, *Paenalcaligenes*, *Bordetella* 属細菌が共通して優占していた。また、最も割合が高かった *Alcaligenes* 属細菌は、「UVA 単独処理」では約 21.5%、「光触媒・BDD 電極併用処理」では約 14.7% を占めていた。また、「光触媒・BDD 電極併用処理」を行うと、*Clostridium* 属細菌が約 4.9% の割合で現れた。

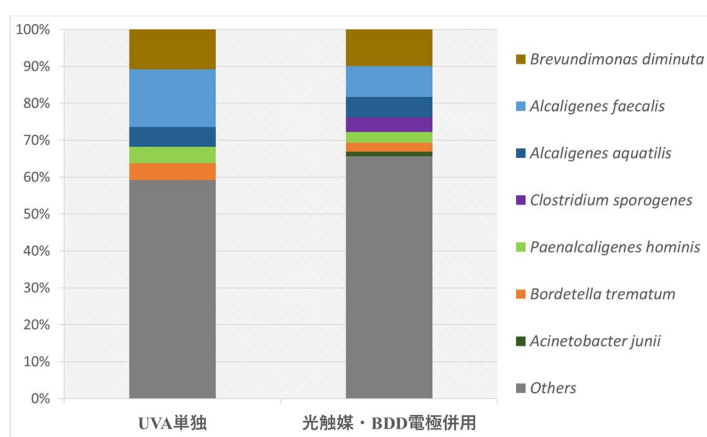


図 3. 生存細菌叢解析結果 (種レベル)

種レベルで「UVA 単独処理」と

「光触媒・BDD 電極併用処理」の

優占種を比較すると、属レベルで上位優占であった *Alcaligenes*, *Brevundimonas* 属にそれぞれ含まれる *Alcaligenes faecalis*, *Brevundimonas diminuta* が優占していた。また、「光触媒・BDD 電極併用処理」では *Clostridium sporogenes* が上位優占種として検出された。

(4) 純粋分離した生存細菌株の系統解析

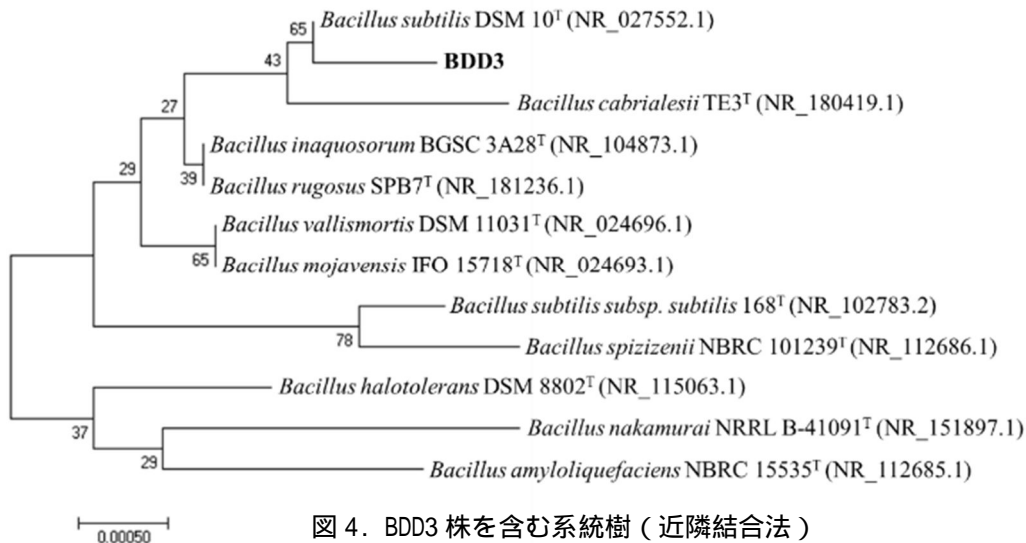


図 4. BDD3 株を含む系統樹 (近隣結合法)

分離株をグラム染色した結果、BDD1 株はグラム陰性の桿菌、BDD2 株はグラム陰性の桿菌、BDD3 株はグラム不定の桿菌であった。

これら 3 株のうち、BDD3 株の 16S rRNA 遺伝子の全塩基配列 1,479 bp (N: 1) を決定した。

MEGA を用いて、Kimura の 2 パラメーター法により距離行列を求め、近隣結合法によって系統樹 (図 4) を作成した。

(5) 殺菌メカニズムの解明

*L. plantarum* JCM 1149<sup>T</sup> に対する殺菌性能評価を行った。*L. plantarum* JCM 1149<sup>T</sup> 懸濁液を対数増殖前期および定常前期まで培養し、光触媒・BDD 電極併用処理を行った結果を図 5 に示す。

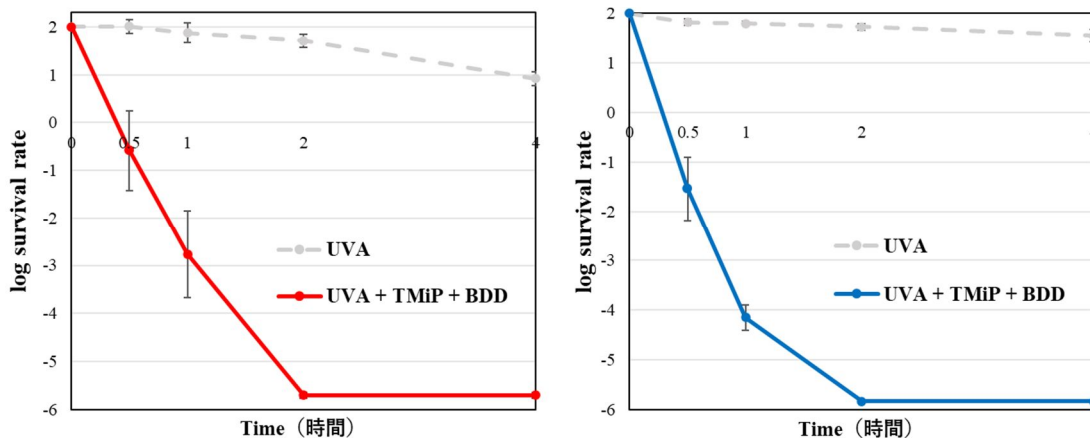


図 5. *L. plantarum* JCM 1149<sup>T</sup> 殺菌性能評価 (左から対数増殖前期、定常前期)

「光触媒・BDD 電極併用処理」は、どちらの生育期でも 2 時間で完全殺菌を達成した。また、「光触媒・BDD 電極併用処理」の条件での対数前期の log survival rate は、0.5 時間: -0.58、1.0 時間: -2.76 となり、定常前期では 0.5 時間: -1.54、1.0 時間: -4.15 となった。したがって、0.5 時間、1.0 時間において、ペプチドグリカン層が厚い定常前期細胞の方が薄い対数前期細胞よりも殺菌されやすい結果となった。

(6) 有効遊離塩素の測定

0.11% NaCl 水溶液に対して、「UVA 単独処理」、「光触媒単独処理」、「BDD 電極単独処理」、「光触媒・BDD 電極併用処理」の 4 種類の処理を行った際に生じる有効遊離塩素濃度を定量した。その結果を図 6 に示す。

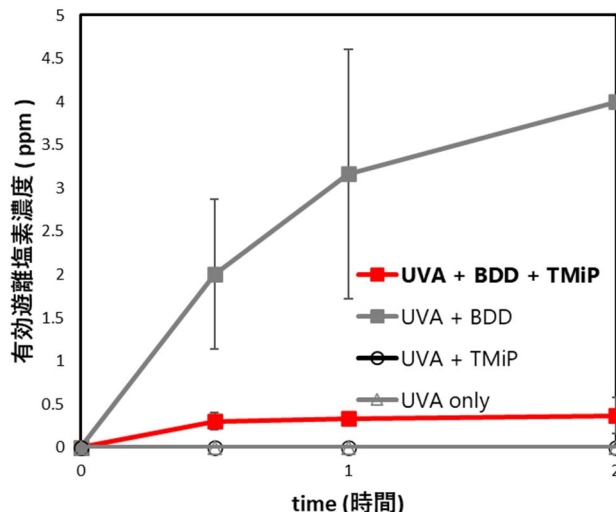


図 6. 生成有効遊離塩素の推移



「UVA 単独処理」、「光触媒単独処理」では、有効遊離塩素の検出はされなかった。「BDD 電極単独処理」では、有効遊離塩素が経時的に上昇する傾向が見られ、4 時間で約 4.5 ppm を示した。「光触媒・BDD 電極併用処理」では、「BDD 電極単独処理」と比較して生成する有効遊離塩素濃度は約 10% に抑えられた。

光触媒反応によって有効遊離塩素が消失しているかを調べるために、初期濃度 10 ppm の次亜塩素酸 Na 水溶液に対して、「UVA 単独処理」と「UVA + TMiP 処理」の 2 条件で実験を行った。その結果、光触媒反応を行った条件 30 分間で有効遊離塩素は検出されなくなった (図 7)。

#### (7) オゾンの測定

滅菌ミリ Q 水に対して、「UVA 照射単独処理」、「光触媒単独処理」、「BDD 電極単独処理」、「光触媒・BDD 電極併用処理」の 4 種類の処理を行い、その際に生じるオゾン濃度を定量した。その結果を図 8 に示す。

「UVA 照射単独処理」、「光触媒単独処理」では、オゾンの検出はされなかった。「BDD 電極単独処理」、「光触媒・BDD 電極併用処理」では、約 0.2 ppm の低濃度のオゾンが検出された。

#### (8) 総括

本研究では、生物学的処理を行った処理水に対して、光触媒反応と BDD 電極反応による汚水浄化技術を組み合わせた併用処理を行い、有機物分解率、殺菌性能、環境汚染物質生成の 3 つの観点から総合的に評価をすることで、環境に負荷をかけない酸化剤生成槽の開発を目的とした。

電流値を上げていくと、有機物分解率とクロロホルム生成量が増加する傾向が確認され、有機物分解率が高くクロロホルム生成量が低い 30 mA が適切な電流値であると判断した。そして、決定した電流値で経時的な有機物分解性能評価を行うと、24 時間で約 80% の有機物が分解された。さらに、光触媒・BDD 電極併用処理を行うことで、BDD 電極で発生する活性酸素種が光触媒反応に関与し、互いの酸化力の向上と新たな活性酸素種の生成によると推定される相乗効果が確認された。

しかし、最適条件で運転した光触媒・BDD 電極併用酸化剤生成槽において、生き残った細菌がメタゲノム解析による非培養法的細菌叢解析や純粋分離による培養法的細菌叢解析で検出された。非培養法では、*Alcaligenes*, *Brevundimonas*, *Paenicaligenes*, *Bordetella*, *Clostridium* 属細菌が優占して生残していた結果となった。培養法では、*B. subtilis* DSM10<sup>T</sup> と近縁な殺菌耐性細菌が分離された。

耐性メカニズム解明のための殺菌性能評価の結果から、当研究室で見出したペプチドグリカン層が光触媒殺菌効果を高める現象と同様に、本酸化剤生成槽でも、光触媒反応とペプチドグリカン層との作用によって、ペプチドグリカン層が厚いグラム陽性細菌に対して殺菌効果が高まった可能性が示唆された。しかし、*L. plantarum* を供試し、ペプチドグリカン層が薄い対数前期細胞と厚い定常前期細胞の両方とも 2 時間で殺菌された結果に着目すると、24 時間併用処理後の耐性メカニズムとして、「ペプチドグリカン層の厚さ」が主に関与しているとは言い切れない結果となった。今後も耐性メカニズム解明のために、培養法的生残細菌叢解析で得られた細菌株を用いて殺菌性能評価などを行うことが必要であると考えている。

最後に、トリハロメタン生成の原因である有効遊離塩素を測定した結果、光触媒と BDD 電極を併用することによって、BDD 単独よりも約 1/10 に抑えられることが判明した。つまり、光触媒・BDD 電極併用処理することで、環境に低負荷な浄化システムとなり得ることが判った。

今後は、生残細菌叢変動解析において耐性菌として検出された細菌が殺菌される条件の検討を行い、その検討結果を解析することで耐性のメカニズムを解明する予定である。そして、有効遊離塩素が光触媒反応によって抑制されるメカニズムも解明することで、完全殺菌および環境に低負荷な酸化剤生成槽の開発に繋がると考える。

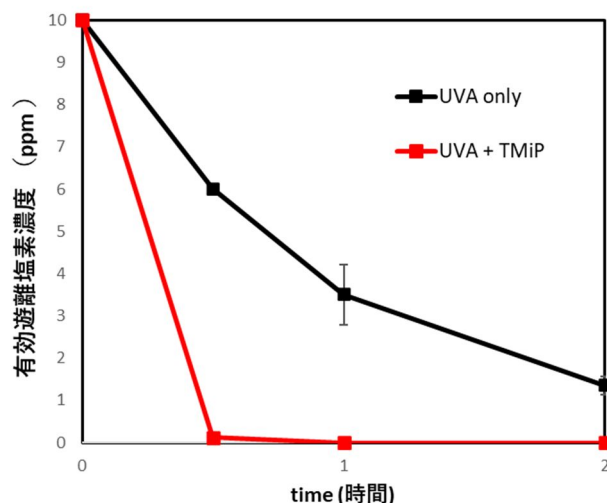


図 7. 初期濃度 10 ppm 次亜塩素酸 Na 水溶液における生成有効遊離塩素の推移

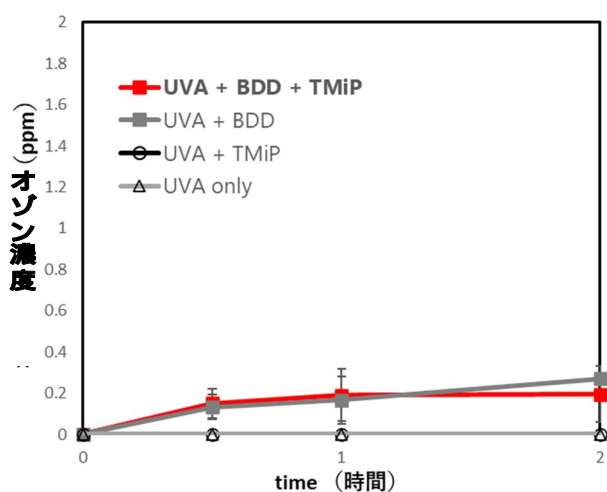


図 8. 生成オゾンの推移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊谷 尚、久保田 智紀、落合 剛、鈴木 智順
2. 発表標題 光触媒と BDD 電極を併用した新しい3次処理技術の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊谷 尚、久保田 智紀、藤嶋 昭、落合 剛、鈴木 智順
2. 発表標題 光触媒とBDD電極を併用した環境に低負荷な3次処理技術の開発
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第49回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊谷 尚、久保田 智紀、落合 剛、藤嶋 昭、鈴木 智順
2. 発表標題 光触媒・BDD電極併用処理による生物学的処理水を最終的に浄化するための酸化剤生成槽の開発
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第48回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷 尚、久保田 智樹、藤嶋 昭、落合 剛、鈴木 智順
2. 発表標題 生物学的処理水を浄化するための光触媒・BDD電極併用処理技術の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保田 智紀、落合 剛、藤嶋 昭、鈴木 智順
2. 発表標題 生物学的処理および光触媒・Boron-doped diamond電極ハイブリッド式汚水浄化システムの構築と環境影響評価
3. 学会等名 光機能材料研究会 第25回シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田 智紀、井手口 真理、佐藤 俊樹、落合 剛、藤嶋 昭、鈴木 智順
2. 発表標題 生物学的処理および光触媒・Boron-doped diamond電極ハイブリッド式汚水浄化システムの構築と環境影響評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	熊谷 尚 (KUMAGAI NAO)	東京理科大学  (32660)	
研究協力者	久保田 智樹 (KUBOTA Tomoki)	東京理科大学  (32660)	
連携研究者	藤嶋 昭 (HUJISHIMA Akira)  (30078307)	東京理科大学・光触媒国際研究センター・荣誉教授  (32660)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	落合 剛  (OCHIAI TSUYOSHI)  (60514114)	神奈川県立産業技術総合研究所・川崎技術支援部・主任研究員    (82718)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関