

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19990

研究課題名（和文）水素ガス添加脱窒槽内で発生した脱窒と高濃度PHA蓄積現象の要因解明と制御法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of a factor affecting PHA accumulation in the sludge of a hydrogen gas supplying denitrification reactor and establishment of a control methodology

研究代表者

亀井 樹 (Kamei, Tatsuru)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80792168

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）：水素ガス添加脱窒処理装置内で発生した脱窒と高濃度PHA蓄積現象の要因の解明や制御方法の確立を試みた。脱窒とPHA蓄積の同時進行が確認された汚泥を用いた脱窒処理装置を作成して様々な条件で運転し、窒素除去率やPHA含有率、関連微生物の種類やPHA合成関連遺伝子情報を調べた。その結果、汚泥への窒素負荷低下や装置の窒素除去率上昇がPHA含有率を向上させる要因であること、優占細菌のThauera属やAzoarcus属がPHA合成酵素を持ち脱窒とPHA合成に関与していることが示唆された。さらに、リン除去も同時進行しており、窒素・リン除去とPHA生産の同時達成を可能にする技術開発につながる知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PHAは良質なバイオガスの基質であるとともに、生分解性プラスチックの材料である。本研究成果を発展させれば、処理対象水に水素ガスを通気するという簡単なアプリケーションで、下水処理場の高度処理化やPHA生産工場化が達成できる可能性がある。大幅な改修を必要とせず下水処理場の高機能化を達成する技術確立につながる知見であり、学術的・社会的にも意義のある成果が得られたと考えている。

研究成果の概要（英文）：We evaluated a factor affecting PHA accumulation in a hydrogen gas-supplying denitrification reactor, to develop a new technology for simultaneous PHA synthesis while in sewage treatment. Suspended sludge-type hydrogen gas supplying denitrification reactor was developed and operated in various operation conditions to check changes in nitrogen removal efficiency and sludge PHA content, and to elucidate microbial community structure and functional gene for PHA synthesis (PhaC gene) abundance. Lower nitrogen loading for sludge and a higher nitrogen removal efficiency in the reactor could be potential factor affecting PHA accumulation in the reactor. Thauera and Azoarcus were dominant bacteria in the sludge and had the PhaC gene, suggesting a contribution to denitrification and PHA synthesis. Furthermore, reactors also showed phosphorus removal along with denitrification and PHA synthesis. These results can lead to new wastewater treatment technology development.

研究分野：環境浄化技術

キーワード：水素ガス 脱窒 ポリヒドロキシアルカン酸

1.研究開始当初の背景

地球温暖化問題や陸・海域のプラスチック汚染を背景に、未利用バイオマス資源からのエネルギー回収や、環境中で分解されるバイオプラスチックの本格利用が目指されている。微生物の資源利用は、食料資源との競合を回避できる点で他のバイオマス資源よりも優れており、その利用促進に期待が集まっている。

ポリヒドロキシアルカン酸(以下、PHA)は、微生物が外的環境変化に対応し生存するためのエネルギー源として細胞基質内に生産・貯蔵する物質で、良質なバイオガスの基質であり、生分解作用を示すバイオプラスチック素材である。PHAの大量生産は下水処理場で排出された余剰汚泥を専用工程に供し生産する方法がある。しかし、専用設備の建設や維持管理に起因する生産コストにより資源価格が上昇し利用促進を阻む。仮に下水処理と同時に高濃度PHA蓄積が達成できれば特殊な蓄積工程が不要になり下水汚泥の直接利用が可能で、総じてPHA生産コストの大幅な縮減につながるが、それを可能にする明確な方法はこれまで提案されていない。

一方申請者は、水素ガスをエネルギーに利用する微生物の脱窒反応(水素酸化脱窒反応)を用いた脱窒処理実験中に、処理装置内部の汚泥に高濃度のPHAが蓄積していたことを発見した。脱窒と高濃度PHA蓄積が同時に進行しており、この要因と制御方法を明らかにして下水処理に適用できれば、発生する汚泥のPHA含有率を高め、直接利用する技術確立につながる可能性がある。

2.研究の目的

以上の背景から、本研究では水素ガス添加脱窒処理装置内部で発生した高濃度PHA蓄積現象を明らかにするため、『なぜPHAが高濃度に蓄積したか?』、『脱窒とPHA蓄積の同時最大化は可能か?』、『関連する微生物は?』、『既存処理に適用可能か?』を課題の核心をなす問いとして定めた。この問いを解決するため、脱窒とPHA蓄積の関係性と同時最大化の最適条件の探索、既存処理への適用可能性の検証、脱窒とPHA蓄積に関連する微生物の特定とPHA蓄積メカニズムの解明、を目的として定め、新規PHA生産方法の確立に資する基礎的情報の整備を行うことを目指した。

3.研究の方法

先行研究にて脱窒反応とPHA蓄積が確認された汚泥を用い研究を進めた。この汚泥は山梨県内の下水処理場の活性汚泥を採取し、水素ガス供給条件下のもと長期間集積培養して取得したものである。この汚泥を種汚泥として利用した水素ガス添加脱窒リアクターを立ち上げ、水素ガス供給量や水理学的滞留時間(HRT)、流入水組成(窒素やリン濃度)などの運転条件を変化させ運転した。窒素除去率変化のモニタリングに加え、適時リアクター内部の汚泥を回収し16S rRNA遺伝子情報を用いた微生物コミュニティ解析やPHA合成酵素に関連する遺伝子(*phaC* 遺伝子)の有無、汚泥中のPHA含有量を分析した。

具体的な実験は、図1に示すラボスケールの脱窒処理装置を用いた。リアクターは容積約3L程度とし、微生物固着担体は用いず浮遊生物法を採用した。この装置に硝酸性窒素と、炭酸水素ナトリウムを炭素源として含む模擬排水を供給し、各種組成をパラメータとして変動させ、それにより生じる応答を調べた。リアクター内部の汚泥は適時抜き取りを行い有機性懸濁質濃度(MLVSS)として1,000 mg/L以下に調整した。なお、脱窒活性を向上させるため、装置内部の水温は30-35℃に調整し、また水素ガス通気量を100 mL/min、50 mL/min、25 mL/minの3条件に設定したリアクターを作成し実験に用いた。

なお、水素ガスは溶解効率を向上させるため散気玉を通じてリアクターに供給した。

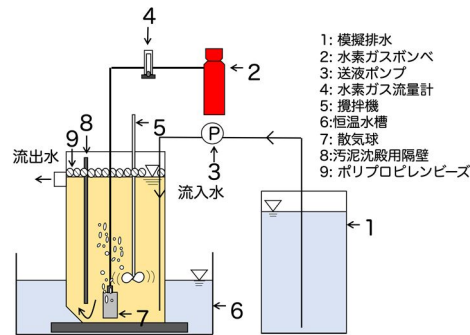


図 1 実験に利用した脱窒処理装置の構造

4.研究成果

上記のような実験方法を用い、いくつか脱窒処理装置を立ち上げて研究成果を報告してきたが、ここではそれらの結果をまとめ要約する。

表 1 は様々な窒素濃度や窒素形態を含む模擬排水をリアクターに通水して運転し、得られた窒素除去率の変化をまとめたものである。水素供給量の違いは窒素除去率に明瞭な変化を与えず、いずれも十分な水素ガス供給量のもと窒素除去が進んでおり、リアクターの窒素除去性能は窒素濃度や窒素形態により変化した。こうした条件の中で汚泥中の PHA 含有率変化を調べると、含有率は短期間で変動しており一部条件（条件 7 や 8 ）では上昇傾向を示した（図 2 ）。

表 1. 運転条件による HD リアクター窒素除去率の変化

条件	流入水中窒素濃度 (mg-N/L)		窒素除去率 (%)		
	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	水素ガス通気量	水素ガス通気量	水素ガス通気量
			100 mL/min	50 mL/min	25 mL/min
1	20	-	33 ± 16	30 ± 14	23 ± 13
2	-	20	84 ± 12	67 ± 6	80 ± 17
3	20	-	52 ± 14	43 ± 18	33 ± 10
4	40	-	14 ± 6	23 ± 14	12 ± 4
5	80	-	5 ± 2	5 ± 2	4 ± 3
6	40	-	13 ± 2	13 ± 1	12 ± 1
7	20	-	38 ± 4	36 ± 4	40 ± 15
8	80	-	6 ± 1	6 ± 1	7 ± 1

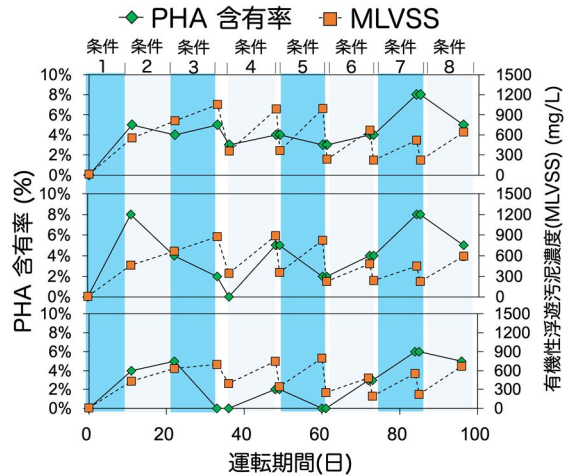


図 2 運転条件の変化による PHA 含有率と有機性浮遊汚泥濃度 (MLVSS) の変化。

そこで流入水組成を固定した上で、HRT を変えて窒素除去率と PHA 含有率の応答を見たところ、HRT の短い条件、すなわち窒素負荷の高い場合に PHA 含有率が減少する傾向を示した。また、水素ガス供給量はリアクター間で最大 4 倍もの差をつけたが、汚泥中の PHA 含有率に差は確認できなかった。そこで、単位汚泥あたりの窒素負荷速度と汚泥中の PHA 含有率、ならびに処理装置が示した窒素除去率と PHA 含有率を整理して比較すると、単位汚泥あたりへの窒素負荷が低い場合、装置の窒素除去率が高い場合、で PHA 含有率が上昇した (図 3)。汚泥への窒素負荷の低下は、窒素除去率の向上と水素ガス供給量の削減による運転コスト低下も期待でき好条件と言える。下水処理水中の硝酸性窒素濃度に応じ処理装置の設計や運転条件の設定により最適条件構築も可能になるため、既存処理への適用可能性を示すとともに有用な知見を得たと考えている。一方で、実用化にはさらなる含有率の向上が必須であり、現在も検討を進めている。

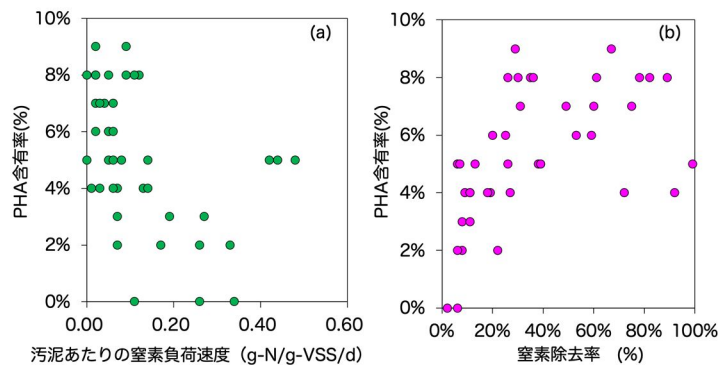


図 3 . PHA 含有率と運転条件や脱窒性能との比較 . (a)PHA 含有率と汚泥あたりの窒素負荷速度, (b)PHA 含有率と窒素除去率.

また、実験期間中に適時汚泥中の細菌相を調べたところ、解析したサンプル全てで *Thauera* spp. と *Azoarcus* spp. が優占化し、総細菌の 60% 以上を占めていた。この 2 属は水素ガス添加脱窒リアクターから頻出しており、本リアクターにおいても汚泥内部で優占化し、脱窒反応に関与していたと考えられる。そこでこの 2 属と PHA 合成との関係性を明らかにするため、PHA 含有率が最大化した条件を対象に汚泥中の *phaC* 遺伝子を調べた (表 2)。解読した *phaC* 遺伝子配列のうち 約 35% (26/75) が *Thauera* 属の持つ PHA 合成酵素に、約 65% (49/75) が *Azoarcus* 属の持つ PHA 合成酵素に、それぞれ 87.77–98.58%

の相同性を示した。この結果は、水素ガス添加脱窒リアクター内に優占化した細菌も同様に PHA 合成酵素を持ち、PHA 蓄積に関与している可能性を示唆した。

表 2 *phaC* 遺伝子配列の解読結果と翻訳された推定酵素

RFLP ID	Number of clones	Assigned accession No.	Nucleotide sequence			Translated protein sequence		
			Top match nucleotide sequences (accession No.)	Length (bb)	Identity (%)	Top match protein sequences [scientific name], (accession No.)	Length (amino acid)	Identity (%)
HD-1	20 (27%)	LC718574	<i>Thauera</i> sp. MZ1T, complete genome, complete genome (CP001281)	425	85.06	poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase, class I [<i>Thauera</i> sp. 27], (EN083003)	141	98.58
HD-2	5 (7%)	LC718575	<i>Thauera</i> sp. MZ1T, complete genome, complete genome (CP001281)	409	90.22	poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase [<i>Thauera</i> sp. 28], (EN091640)	136	98.53
HD-3	48 (64%)	LC718576	<i>Azoarcus</i> sp. KH32C DNA, complete genome (AP012304)	422	86.60	class I poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase [<i>Azoarcus taiwanensis</i>], (NMGO4252)	140	89.93
HD-4	1 (1%)	LC718577	<i>Azoarcus</i> sp. KH32C DNA, complete genome (AP012304)	422	86.12	class I poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase [<i>Azoarcus taiwanensis</i>], (NMGO4252)	140	87.77
HD-5	1 (1%)	LC718578	<i>Thauera</i> sp. MZ1T, complete genome, complete genome (CP001281)	414	90.34	poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase [<i>Thauera</i> sp. 27], (EN080756)	137	98.54

一方で、模擬排水中のリン酸イオン濃度を段階的に増加させ PHA 含有率の変化を調べたところ、汚泥中の PHA 含有率に顕著な変化は確認できなかったが、窒素除去率の低下、汚泥沈降性 (SVI) や汚泥中の揮発性有機物の割合の変化、リン酸イオン除去率の向上、が確認できた (表 3)。リン濃度の増加により汚泥性状 (沈降性の悪化) が変化したことが窒素除去率の低下につながったと考えているが、現在もその要因や対処方法を検討中である。

表 3 流入水中のリン濃度による窒素除去率とリン除去率への影響

Influent PO ₄ ³⁻ (mg-P/L)	VSS conc. (g/L)	TSS conc. (g/L)	SVI (mL/g)	Sludge VSS/TSS ratio (wt%)	NRE (%)	PHA content (wt%)	Phosphorus removal (%)	pH	Dissolved hydrogen conc. (mg/L)	DO (mg/L)
2.5	0.32±0.12	1.01±0.42	111±39	33±4	95.3±2.5	4±1	24.3±6.2	9.95±0.12	1.55±0.03	0.47±0.06
5.0	0.39±0.09	0.79±0.13	125±15	49±3	65.7±18.2	4±0	39.2±4.8	9.62±0.09	1.54±0.01	0.44±0.24
7.5	0.36±0.02	0.63±0.06	171±32	58±6	32.7±9.1	5±1	41.8±4.3	9.43±0.12	1.51±0.02	0.56±0.07

以上の結果から、水素ガス添加脱窒リアクター内部汚泥の PHA 含有率の向上には、汚泥への窒素負荷の低下や窒素除去率の上昇が要因であることや、汚泥内に優占した細菌が PHA 合成酵素を有し PHA 蓄積に関与している可能性が示唆された。また、リアクターは脱窒と PHA 合成に加え、リン除去能力も有することが明らかとなった。下水処理場への窒素やリン除去機能の実装が閉鎖水域を含む水環境保全に望ましく、既存設備の改修作業が全国で進められている。しかし、改修はコストの面から段階的に進められており抜本的な更新には時間を要している。本研究成果を応用・発展することで、処理対象水に水素ガスを供給するという簡便なアプリケーションで、窒素・リンの同時除去や、さらには処理で発生する汚泥の PHA 含有率の向上と直接資源利用が可能になると考えており、画期的な下水処理や資源生産技術の開発につながる有用な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tatsuru KAMEI, Suphatchai RUJAKOM, Takashi FURUKAWA, Yasuhiro TANAKA, Kazunari SEI, Futaba KAZAMA
2. 発表標題 Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in the Hydrogenotrophic Denitrification Reactor: Effect of Phosphorus Concentration on Sludge PHA Content
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference Online2022(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀井樹, Suphatchai Rujakom, 風間ふたば
2. 発表標題 水素ガス添加脱窒リアクター内のポリヒドロキシアルカン酸生成に関する諸検討
3. 学会等名 日本陸水学会甲信越支部会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------