

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月26日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510084

研究課題名（和文）

低分子ポリ乳酸を用いた低コスト型新規生物学的脱窒プロセスの開発

研究課題名（英文）

Development of low-cost biological denitrification processes using poly (L-lactic acids) having low molecular weight

研究代表者

山田 剛史 (YAMADA TAKESHI)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90533422

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ポリ乳酸（PLLA）を生物学的脱窒プロセスの外部電子供与体として利用する技術開発を行った。重量平均分子量および結晶化度の適切なコントロールが、PLLAからの非生物学的な乳酸（電子供与体）の放出には重要であった。また、*nirS* および *nirK* 遺伝子の転写産物を標的とした分子生物学的解析は、プロセス内の主要な脱窒細菌が、コマモナス属、タウエラ属、アルカリジェネス属やカステルラニエラ属に属することを示した。

研究成果の概要（英文）：

This study was performed to develop a technology for use of poly (L-lactic acid) (PLLA) in biological denitrification processes as an external electron donor. Appropriate control of weight-average molecular weight and crystallinity was important to enhance abiotic release of lactate (electron donor) from the PLLA. In addition, *nirS* and *nirK* transcript-targeted molecular analyses revealed that major denitrifying bacteria in the processes were members of genera *Comamonas*, *Thauera*, *Alcaligenese* and *Castellaniella*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：ポリ乳酸、脱窒細菌、固相脱窒法、未利用バイオマス、電子供与体、環境浄化

1. 研究開始当初の背景

廃水処理プロセスにおける重要な課題の一つとして、富栄養化の原因物質である硝酸塩の効率的除去があり、一般的に生物学的脱窒によって除去されている。しかし、脱窒に

必要な還元力は不足しがちで、必ずしも効率的な脱窒ができないという大きな問題がある。これを解決する有効な手段として、脱窒に必要な電子供与体・炭素源として固体の生分解性ポリマーを利用する固相脱窒法が注

目されている。生分解性ポリマーとしては、生分解性プラスチックの素材であるポリヒドロキシ酪酸 (PHB)、PHB とポリヒドロキシ吉草酸の共重合体 (PHBV)、ポリカプロラクトン (PCL) 等の脂肪族ポリエステルが有効とされている。一方、現在まで、石油系プラスチックの代替材として最も注目されているポリ乳酸 (PLLA) は生分解性がきわめて悪く、固相脱窒の基質としては機能しにくいとされてきた。

2. 研究の目的

本研究では、PLLA の重量平均分子量を変えることによりプラスチック本来の機能を有しつつ、生分解性を向上させることが可能ではないかという作業仮説に基づいて、低分子 PLLA や様々な結晶化度を持つ PLLA を合成し、固相脱窒法への応用を試みる。また、低分子 PLA 系固相脱窒プロセスの窒素除去能力を評価し、その系の群集構造と機能解析を行ない、実際に主要な役割を果たしている脱窒菌の正体を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PLLA 添加固相脱窒プロセスの硝酸除去特性

本研究では、高温・高圧処理による低分子化や融解・再結晶化による結晶化度の調節により、様々な重量平均分子量や結晶化度を持つ PLLA を合成した。次に、活性汚泥を下水処理場から入手し、これを接種源としたバイアル試験を行い、それぞれの物性を持つ PLLA における硝酸除去速度を評価した。また、反応溶液にあたり添加量の違いによる硝酸除去速度の比較も行った。さらに、1,000 ml 容の回分式脱窒リアクターを用いて、約 2 ヶ月間に渡って連続的な硝酸除去試験を行った。

(2) PLLA 添加固相脱窒プロセス内の脱窒細菌群集の遷移及び多様性

PLLA 添加脱窒リアクターにおける高活性脱窒細菌の質的・量的分布を明らかにするために、各リアクターより経時的に採取した汚泥から全 RNA を抽出し、*nirS* および *nirK*-mRNA を標的とした定量 PCR、Terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) 法を基にした多次元尺度法、およびクローンライブラリー解析を行った。

4. 研究成果

(1) PLLA 添加固相脱窒プロセスの硝酸除去特性

本研究では、固相脱窒法に PLA を用いるために、特に PLA の分子量と結晶化度に着目し、様々な重量平均分子量や結晶化度を持つ PLA ペレットを用いてその加水分解性をバ

イアル試験で調べた。また、それらの PLA と活性汚泥を用いた硝酸除去速度の比較も同様にバイアル試験で評価した。その結果、PLA の低分子量化および高結晶化によって、物理化学的な PLA の加水分解が促進され、硝酸除去速度が増加することが示された。これらの結果は、環境技術に適用する前に、その技術に必要な乳酸供給速度にあうように PLA の物性を改質すれば、PLA が固相脱窒法に適用可能であることを示している。さらに本研究では、重量平均分子量や結晶化度を調節した様々な PLA ペレットを唯一の基質（電子供与体）とした固相脱窒リアクターを構築し、どの程度に改質した PLA が固相脱窒リアクターの基質として好適であるかを調べるため、様々な平均分子量を持つ PLA ペレットを作製して固相脱窒リアクターを用いた回分試験を行った。その結果、重量平均分子量約 $10,000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ および結晶化度 40%程度に調節した PLA ペレットを用いれば、標準的な下水活性汚泥に相当する硝酸除去速度 ($3\text{-}5\text{ mg}\cdot\text{NO}_3\text{-N}\cdot\text{g}\cdot\text{MLSS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) と安定的な硝酸除去処理効率が得られることがわかった。次に、最適改質条件で作製した PLA をどの程度反応槽への添加が望ましいかを評価するため、反応容積に対して 1、3、および 5%添加した回分式固相脱窒リアクターを構築した。各回分式脱窒プロセスは、MLSS 濃度 ($2,000\text{ mg/l}$) を調整し、約 2 ヶ月間に渡って運転した。3%PLLA 添加固相脱窒プロセスでは、他の 2 つのプロセスと比較して、運転に伴って硝酸除去速度が増加することが分かった。

(2) PLLA 添加固相脱窒プロセス内の脱窒細菌群集の遷移及び多様性

PLLA 添加脱窒リアクターにおける高活性脱窒細菌の質的・量的分布を明らかにするために、定期的に採取したプロセス内汚泥より、RNA を抽出し、*nirS*-mRNA、*nirK*-mRNA および 16S rRNA を標的とした定量的リアルタイム PCR 法による全細菌および *nirS* および *nirK* タイプの脱窒細菌の動態を調査した。その結果、各脱窒プロセスでは、*nirS* および *nirK* 両遺伝子の転写産物が確認され、その転写量は、硝酸除去速度に関連した増減が観察された。これらの結果は、PLA を添加した脱窒プロセスでは、*nirS* および *nirK* 遺伝子を持つ両タイプの脱窒細菌が硝酸除去を担っていることを明らかとなった。各プロセス運転に伴う高活性脱窒細菌の遷移を比較するため、*nirS*-mRNA、*nirK*-mRNA を基にした T-RFLP 解析を行った。各種脱窒細菌群集の遷移は、T-RF ピークを基にそれぞれのピークの割合を算出し、運転期間内の脱窒細菌群集の類似性を多次元尺度法により評価した。その結果、10-15 種の T-RF 断片が確認され、多様な *nirS* および *nirK* タイプの脱窒細菌が関与してい

ることが判明した。運転期間内の脱窒細菌群集の類似性を多次元尺度法により評価したところ、運転するにつれ脱窒細菌群集が遷移していた。しかし、1%および3%PLA添加脱窒プロセス内の脱窒細菌群集はほぼ似たような遷移を示すが、5% PLA添加脱窒プロセスでは、脱窒細菌群集が大きく異なることが示された。このことは、乳酸供給量の増大により、脱窒細菌群集の構造に影響を与えたものと推察された。さらに本研究では、プロセス内の詳細な脱窒細菌の多様性を明らかにするために、硝酸除去効率や速度が顕著であった3%PLA添加脱窒プロセスの馴養化された汚泥(運転開始2ヶ月)を用いて行った。採取した汚泥よりRNAを抽出し、*nirS*-mRNA、*nirK*-mRNAを基にしたクローンライブラリ解析を行った。その結果、結果、タウエラ属(*nirS*)、コマモナス属(*nirS*)、アルカリジエネス属(*nirK*)、カステルラニエラ属(*nirK*)細菌が主たる優占種であり、PLLAから放出される乳酸を巡り様々な脱窒細菌が脱窒反応を担っていることが分かった。

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4件)

1. 山田剛史, 平石明, 2011. ポリ乳酸廃材を用いた環境浄化・エネルギー回収技術の開発と展望, 月刊ファインケミカル, vol. 40 (9): 12-19 査読無
2. Takahashi, M., T. Yamada, M. Tanno, H. Tsuji and A. Hiraishi. 2011. Nitrate removal efficiency and bacterial community dynamics in denitrification processes using poly (L-lactic acid) as the solid substrate, *Microbes Environ.*, vol. 26: 212-219 査読有
3. 山田剛史, 平石明, 2011. 「ポリ乳酸」の新しい活用法 -生物学的脱窒プロセスにおける還元力供給材料-, *MATERIAL STAGE*, vol. 10 (12): 23-26 査読無
4. 山田剛史, 2010. ポリ乳酸の廃水処理技術利用への展望 -プロセス内で機能する微生物群に迫る-, *微生物生態学会誌*, vol. 1: 14-15 査読無

[学会発表] (計13件)

1. 松岡宏行, 山田剛史, 辻秀人, 平石明. ポリ乳酸添加固相脱窒リアクター内の脱窒細菌群集の動態と多様性. 日本農芸化学会 2012 年度大会. 平成 24 年 3 月 23 日～26 日. 京都女子大学.
2. 川島淳一, 山田剛史, 平石明. 脱窒細菌の細胞レベルにおける簡易生菌数計測法の開発. 日本農芸化学会 2012 年度大会. 平成 24 年 3 月 23 日～26 日. 京都女子大学.

3. 山田剛史, 辻秀人, 平石明. ポリ乳酸系バイオポリマーを単一の電子供与体として用いた脱窒反応槽内の脱窒細菌群集の遷移および多様性. 第 46 回日本水環境学会年会. 平成 24 年 3 月 14 日～16 日. 東洋大学.
4. Matsuba, M., T. Yamada, A. Hiraishi. Gene-based fluorescence in situ hybridization to distinguish denitrifying bacteria having different nitrite reductase genes in ecosystems. The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011. 平成 23 年 11 月 17 日～18 日. 豊橋技術科学大学.
5. Yamada, T., H. Tsuji, and A. Hiraishi. Nitrate removal and bacterial population dynamics in wastewater treatment processes using poly (L-lactic acid) waste for biological denitrification. The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011. 平成 23 年 11 月 17 日～18 日. 豊橋技術科学大学.
6. 山田剛史, 辻秀人, 平石明. ポリ乳酸を単一基質として用いた脱窒リアクター内の脱窒細菌群の動態と多様性. 第 27 回日本微生物生態学会. 2011 年 10 月 8 日～10 日. 京都大学.
7. 横瀬和哉, 山田剛史, 丹野基裕, 辻秀人, 平石明. ポリ乳酸を基質とする固相脱窒系内の *nirK* 型脱窒細菌の動態と多様性. 環境バイオテクノロジー学会 2011 年度大会. 2011 年 6 月 20 日～21 日. 東京大学.
8. 山田剛史, 辻秀人, 平石明. ポリ乳酸添加固相脱窒反応槽内における脱窒細菌群の動態および多様性. 第 26 回日本微生物生態学会. 2010 年 11 月 24 日～26 日. つくば大学.
9. 山田剛史, 丹野基裕, 辻秀人, 平石明. 改質ポリ乳酸を用いた固相脱窒反応槽の硝酸除去特性と高活性脱窒細菌群集の解析. 環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会. 2010 年 6 月 21 日～22 日. 東北学院大学.
10. 山田剛史, 丹野基裕, 辻秀人, 平石明. 改質ポリ乳酸を用いた固相脱窒プロセスによる硝酸除去特性と脱窒細菌群集構造解析. 第 44 回日本水環境学会年会. 2010 年 3 月 15 日～17 日. 福岡大学.
11. 丹野基裕, 山田剛史, 辻秀人, 平石明. 改質ポリ乳酸を用いた固相脱窒プロセスによる硝酸除去特性と脱窒細菌群集構造解析. 第 25 回日本微生物生態学会. 2009 年 11 月 21 日～23 日. 広島大学.
12. 丹野基裕, 山田剛史, 辻秀人, 平石明. 改質したポリ乳酸廃材を用いた新規生物学的窒素除去技術の開発. 第 61 回日本生物工学会年会. 2009 年 9 月 23 日～25 日. 名古屋大学.

13. 山田剛史, 丹野基裕, 高橋正亮, 辻秀人, 平石明. 低分子ポリ乳酸廃材を用いた生物学的脱窒プロセスの窒素除去特性と細菌群集構造の比較. 環境バイオテクノロジー学会 2009 年度大会. 2009 年 6 月 23 日～24 日. 東京大学.

[図書] (計 1 件)

1. Hiraishi, A., 2010. Environmental application. In poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing and Applications ed. by Auras, R., Lim, L.-T., Selke, S. E. M., and Tsuji, H., Wiley, 477-485.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: 電子供与体供給剤および、それを用いた環境浄化方法
発明者: 山田剛史, 平石明, 辻秀人, 松岡宏行, 吉川成志
権利者: 豊橋技術科学大学, 東洋製罐株式会社
種類: 特許権
番号: 特願 2012-022257
出願年月日: 2012 年 2 月 3 日
国内外の別: 国内
2. 名称: 電子供与体供給剤、電子供与体供給剤の製造方法および、それを用いた環境浄化方法
発明者: 平石明, 辻秀人, 山田剛史
権利者: 豊橋技術科学大学
種類: 特許権
番号: 特願 2009-264383, 特開 2011-104551
出願年月日: 2009 年 11 月 21 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://ens.tut.ac.jp/microbes/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 剛史 (YAMADA TAKESHI)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 90533422

(2) 研究分担者

平石 明 (HIRAISHI AKIRA)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 40283486

(3) 連携研究者

なし