

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 27 日現在

機関番号：25406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25550095

研究課題名(和文) カキ殻バイオフィーム利用によるリン回収型浄化処理システムの開発

研究課題名(英文) Development of phosphorus-recovery purification system using oyster-shell biofilm

研究代表者

増山 悦子 (MASUYAMA, Etsuko)

県立広島大学・人間文化学部・講師

研究者番号：10084162

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)：養豚場で発生する汚水には、高濃度のリンが含まれており、排水時は積極的なリンの除去が求められている。また、リンは枯渇が懸念される有限資源であるため、汚水中のリンを回収し再利用することが望まれる。本研究では養豚業の小規模事業所向けに、汚水の排水浄化を低コストで運用したリン回収システムを開発した。カキ殻を担体にした成熟バイオフィームは高い浄化能を持つばかりでなく、有機リン化合物を吸着し菌体にポリリン酸として取込むことが可能である。副産物のカキ殻バイオフィームはリン酸質肥料へ再利用することや脱着させてリンを回収することも可能である。

研究成果の概要(英文)：Wastewater from pig farms contains phosphorus in high concentrations. The removal and recovery of phosphorus for reuse is considered desirable as phosphorus is a limited natural resource. We developed a phosphorus recovery system with low operating cost for purifying wastewater runoff at small-scale facilities in the swine industry. The system, which consists of a mature biofilm with oyster shell as the carrier, has a high purification capacity. Organic phosphorus compounds are adsorbed by the oyster shell and are taken up by microbes as polyphosphoric acid. Possible uses of the shells and biofilm matrix include phosphatic fertilizer production and desorption for phosphorus recovery.

研究分野：環境生化学

キーワード：バイオフィーム カキ殻 リン回収

1. 研究開始当初の背景

(1) 養豚業で発生する豚舎汚水には、水質汚染物質である高濃度のリンが含まれており、汚水中のリン除去は重要な課題となっている。また、リンは枯渇が懸念される有限資源であるため、汚水中のリンを回収し再利用することが望まれている。

(2) 近年、豚舎汚水の MAP 結晶化反応を利用した方法により、リンを回収する技術が実用化されている。MAP 結晶化反応には、pH 調節やマグネシウムの投与、曝気などを人工的に誘導する必要がある。養豚業種の小規模会社にとって、化学処理の汚水浄化を実施するには、設備コスト高と管理面の複雑さに課題があるとされている。低コストで運用可能な汚水浄化とリン回収ができる新たなシステムが求められている。

(3) 細菌は単独ではなくバイオフィームという共同体を形成して、外界の環境変化に影響を受けず、効率良く生育している。その機能を有効利用して河川の自浄作用が行われている。浮遊状態ではなく、カキ殻担体に固定させた細菌類は分泌する細胞外多糖 (EPS) などに厚く覆われたバイオフィームという共同体を形成することから、外界の環境変化に影響を受けず、効率良く生育できる機能性を持ち、排水浄化材として最適であると考えられる。

(4) 微生物を利用した汚水浄化として、広島県特産品の生カキ製造時の産業廃棄物となるカキ殻を担体にしたバイオフィームを作製し、家庭雑排水の浄化の予備試験に着手している。高濃度リン排水においても、バイオフィーム細菌内にリンの取込が可能であると考えられる。

(5) カキ殻バイオフィームへ吸着、細菌自体へ取り込まれたリンはカキ殻に保持した状態で、リン酸質肥料や土壌改良材などのリン付加価値の高い製品として加工、再利用することが可能である。カキ殻の再利用は循環型社会の実現に寄与することができる。

2. 研究の目的

カキ殻担体に繁殖旺盛な細菌を成熟バイオフィーム状態に保持できるようにした排水浄化材を用いて、養豚業などの小規模事業所向けに、排水浄化を低コストで運用し、カキ殻資材に付加したリンをリユースできるシステムを構築することが目的である。

(1) 高効率な浄化能を保持したカキ殻バイオフィームの形成条件の検討

カキ殻に吸着した細菌類が分泌する細胞外多糖 (EPS) などに厚く覆われた成熟バイオフィームの構造、形成条件を明らかにす

る。

(2) 成熟バイオフィームによる汚水浄化をラボレベルで検証する。

成熟バイオフィームのリン化合物の吸収や取込機能を明らかにする。

(3) 酒米洗米水、豚舎汚水など小規模事業所の現場に応じた排水浄化、リン回収法を提案する。

3. 研究の方法

(1) カキ殻を基盤としたバイオフィームを形成させ、生物活性が高効率となる成熟バイオフィーム作製条件の検討

バイオフィーム構造解析 (電子顕微鏡観察、蛍光顕微鏡観察)

成熟バイオフィーム形成のための要因解析

環境ストレス負荷実験 (pH 変化、温度変化、湿度変化の各項目) 後に CV 色素吸着量を測定し成熟バイオフィーム形成能解析、及び電気泳動による酵素活性の解析 (プロテアーゼ、フォスファターゼ)

(2) 汚水浄化の検証

小規模事業所の有機廃棄物 (酒米洗米水、豚舎汚水) の浄化を現場において試み、効率の良い浄化法の検討 (PCR-DGGE 微生物群集による微生物叢の解析、水質検査、及びポリリン酸の取込) を実施する。

4. 研究成果

(1) カキ殻成熟バイオフィーム

カキ殻は細菌の接着の担体として優れた構造を持つ。

カキ殻は葉状に切り立った複雑な凹凸形状をしており、不規則な間隙が多いという特異な表面構造が観察された (カキ殻の表面構造の走査電子顕微鏡図 1)。

細菌種は枯草菌 (*Bacillus subtilis*) が最適である。

枯草菌は有機物等を分解する酵素を分泌し、グラム陽性で、環境の悪化に伴い自衛手段として芽胞を形成し休眠状態になり、条件が良くなると成熟したバイオフィームを形成している。

成熟バイオフィームを作製するには、乾燥ストレスを与える方法が有効である。

枯草菌をカキ殻に接着した後に、乾燥負荷や高温負荷 (90℃, 15-30 分) のストレス負荷を与えると、安定した成熟バイオフィームを形成する (蛍光顕微鏡による観察、図 2)。酒米洗米水浄化の現場においてカキ殻バイオフィームの乾燥を繰り返すことにより浄化効果が高まった。

成熟したバイオフィルムの形態像は、菌外に糖のポリマーを分泌した微生物集団を形成している（走査電子顕微鏡図3）。

多数の短桿菌が多糖類などの分泌物質に覆われて連なっている走査電子顕微鏡像が観察された。次に全細菌に水分と栄養分を補給する水路を作るために、柱状に増殖・成長し、枯草菌が重なり合って細菌集団を形成している様子が、生死菌判別蛍光色素で染色したバイオフィルム菌で観察された。

(2)カキ殻成熟バイオフィルムを用いた有機廃棄物汚水の浄化

酒米洗米水の浄化への試み

カキ殻を基盤とした成熟バイオフィルムを用いて、澱粉、タンパク質などの有機物を多く含んだ酒米洗米水を対象にしてラボスケールで浄化試験を次の条件下で実施すると、COD値、全リン量、全窒素量のそれぞれの水質検査結果が約80%減少していた（図4、表1）。酒米洗米水に約1/10量のカキ殻バイオフィルムを入れ、1日間の曝気と水温を10~25に保持する条件下で、濁っていた洗米水が1日後に浄化され透明になった。通性細菌の生育には曝気が必要だがバイオフィルム内では、一時的に嫌気性環境にもなるため、脱窒が進行して窒素ガスが産生され、窒素成分が除去できるものと考えられる。

多価酸性物質を染色するトルイジンブルーでカキ殻バイオフィルム菌を染色すると、強い陽性反応が認められ、細菌内にポリリン酸として蓄積されていることが確かめられた（図5）。

次に酒造会社（広島県庄原市 比婆美人酒造）において現地で浄化試験を行ったところ、酒米洗米水18tの大容量スケールでも同様な浄化結果を得た。ただし、洗米水に対して約1/50量のカキ殻バイオフィルムを編み袋に入れて洗米水上層部に浮き具で固定し、曝気を行った。冬期の使用のため水温を10に加熱した条件が最適であった（図6 酒造会社の浄化タンク内の酒米洗米水浄化）。バイオフィルム菌の細菌叢をPCR-DGGEで解析すると、添加した湖沼浄化菌のFM菌（ユニバーサル開発（株））だけでなく多数の細菌群から構成されていた（図7）。

この酒造工場では経年にわたって、カキ殻バイオフィルムの交換をすることなく、タンク内に装置した状態で酒米洗米水の浄化能を維持している（2013年12月~2016年2月、企業報告書「カキ殻バイオフィルムによる酒米洗米水浄化」増山悦子著）。仕込み時期である冬期だけ浄化装置を稼働するため、カキ殻バイオフィルムは、休止期は乾燥ストレスに曝されている。この周期は成熟バイオフィルムの形成にも適しており、メンテナンスの省力化を図ることができると思われる。生物利用の水浄化においては、安定性に欠けるとされるが、成熟バイオフィルムのカキ殻浄化は

低コストで安定して運用できることが判明した。

養豚場における豚舎汚水の浄化とリン回収

広島県庄原市の養豚会社N社の豚舎汚濁水を沈殿させた上清を検水の汚水とした。酒米洗米水浄化に使用した成熟バイオフィルムのカキ殻を用いて、研究室レベルでの浄化を試みた。

汚水を大きさの異なる3種類（全殻、砕殻、紛殻）に浸漬し2週間曝気後の水質検査では水質改善がみられた（図8、表3）。どの大きさのカキ殻でも、CODは80%以下（100ppm）に減少し、リンの除去率は約80%であった。また、全窒素量はカキ殻の小さいほど浄化効率が低いことが確かめられた。

季節変化（4月から12月までの偶数月/2015年）を追ってみると、夏季では、遊離した細菌が多くなるにつれて、全リン量、全窒素量ともに増加がみられた。夏季の汚水処理は、カキ殻バイオフィルム処理前に、スポアコンLPC（ユニバーサル開発（株））添加による消臭を増やし、カキ殻バイオフィルムによる浄化を行う方が有効であった。汚水原水のpHは8.0付近で、カキ殻バイオフィルムを入れると、pH7.4~7.8であるため、MAPやHAPなどの結晶化は起こりにくいと考えられる。

カラム操作によるリン回収の検討では、担体に大きさの異なるカキ殻を層にして汚水を流して吸着、溶出した際のリン回収を試みた。50mM EDTA水溶液と0.2% SDS溶出液のいずれも、カキ殻バイオフィルムからリン溶出量は少なく、溶出液の濃縮工程を必要とすることから、コスト高になり、カラムによるリン回収は難しいと判断した。成熟したバイオフィルム菌の離脱には、強酸や強塩基溶液での抽出が最適であると考えられるが、リン回収後の副産物利用には不向きである。浄化材のカキ殻を粉碎、乾燥させて、リン付加した肥料として再利用することを提案した。

養豚汚水浄化は、汚濁物を沈殿地で沈殿させたのち、第1槽に成熟バイオフィルムを形成させたカキ殻を粉碎したものを半分量入れる。それに上澄みの汚水を入れる。汚水を強制曝気し1~2週間後に、全殻カキ殻の入った第2槽に移送し水質検査を行い結果に応じて排水する方法を提案した（企業報告書「カキ殻バイオフィルムによる養豚場汚水浄化」増山悦子著「高機能性カキ殻バイオフィルムを用いた排水浄化とリン回収」増山悦子、投稿準備中）。

また、現場においては夏季に異臭対策のために消臭菌の投入やカキ殻バイオフィルムによる浄化処理工程を増やす必要があることから、特別な処理を図る必要がある。

<成熟バイオフィルム>

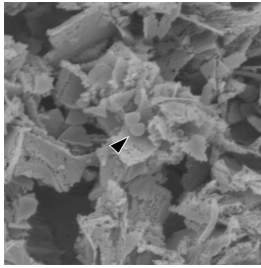


図1
カキ殻の表面構造
走査顕微鏡像

矢頭は接着した短桿菌

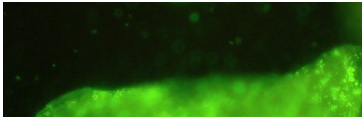
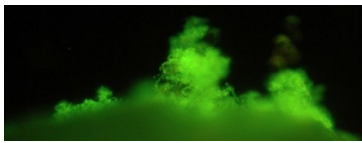


図2
a カキ殻に
生細菌の接着



b 成熟バイ
オフィルム
の蛍光顕微
鏡像



(上図の模式
図)

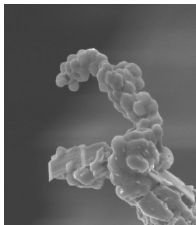


図3
成熟バイオフィルムの電子
顕微鏡像

糖のポリマー(EPA)を分泌
して柱状を示す細菌群集

<カキ殻バイオフィルムによる酒米洗米水の浄化>

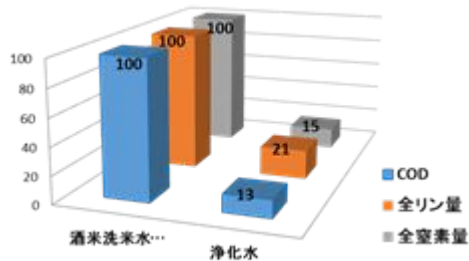
図4 酒米洗米水の浄化



原水

+カキ殻
浄化水+カキ殻
(20 , 曝気, 24hr)

表1 カキ殻バイオフィルムによる酒米洗米水の水質検査 (約80%の除去率)



<ポリリン酸として取り込んだ細菌>

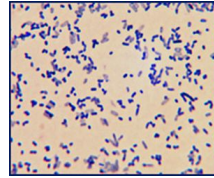


図5
トルイジン染色像
光学顕微鏡図 X1000

<小規模酒造会社における酒米洗米水浄化の検証>

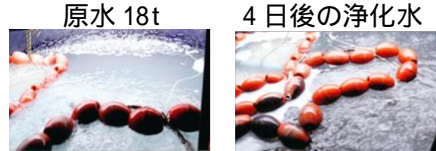


図6 浄化タンク内の酒米洗米水
(浮き具内には全殻バイオフィルム)

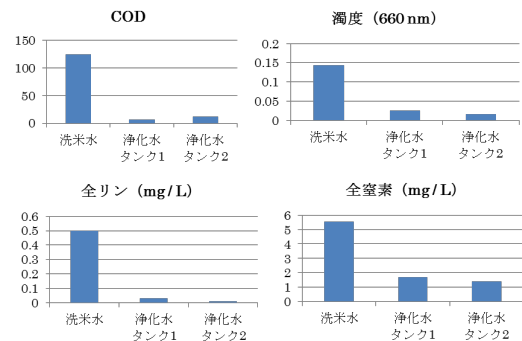
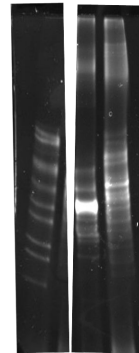


表2 酒米洗米水の水質検査
(タンク1, 2とも高浄化効率を示す)

図7 カキ殻バイオフィルム菌のPCR-DGGE プロファイル



DGGE マーカー-DNA
添加した FM 菌
タンク1のバイオフィルム菌

<舂殻バイオフィルムによる養豚汚水の浄化>

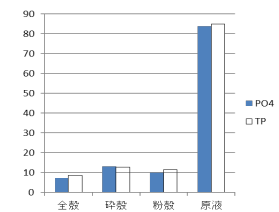
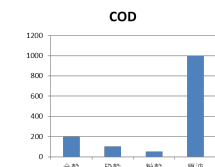


図8 養豚汚水とカキ全殻

表3 水質検査



本研究において、細菌をカキ殻担体に接着の後、乾燥ストレスに繰り返し晒すことにより、簡単に成熟したバイオフィルムを形成できることを明らかにした。成熟バイオフィルムの形態観察により、細菌は分泌した多糖ポリマーで覆われて、環境変化の影響を受けにくい比較的頑丈な構造であることから、排水浄化に最適である。また生化学的研究も進めており、プロテアーゼ活性やフォスファターゼ活性が強く、有機物質の分解に適していると考えられる。実際に事業所で浄化に使用するカキ殻バイオフィルムが少量で浄化可能であることから、カキ殻バイオフィルムは高性能を持つことが分かる。

付着性質のカキは他種貝類と異なる殻形成をする生態であるため、殻構造に特徴がある。細菌の接着に適した極小の間隙を持つ殻構造は、バイオフィルム担体に最適であるとともに、産廃物のカキ殻のリユースを図ることができる。

カキ殻を基盤にした成熟バイオフィルムは高い浄化能を持つばかりでなく、リン化合物を吸着し菌体にポリリン酸として取込むことを明らかにしている。使用後のカキ殻はリン酸質肥料や土壌改良材として再利用できる。

カキ殻バイオフィルムを使用した浄化装置は低コストで大掛かりな装置も必要とせず、安全であることから、小規模事業所の酒造業、養豚業で使用可能であることが実証できている。

カキ殻バイオフィルムによる養豚場汚水浄化の今後の課題は、汚水量や季節に応じたきめ細かい対応策を図ることが必要であると考えられる。具体的には浄化槽の増減や、界面活性剤が混入している市販の消臭菌の投入量の考慮などがあげられる。

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 3件)

Etsuko Masuyama,

Two active flagments of outer arm dynein from *Tetrahymena* cilia; Purification of Fragment- and .Bull. of the Faculty of Human Culture and Science, Pref. Unive. of Hiroshima (無) 11(2016)43-54.

増山 悦子,

チューブリン相互作用による *Tetrahymena* 繊毛外腕ダイニン頭部の構造変化. 県立広島大学人間文化学部紀要(無)11(2016) 55 - 64 .

内藤佳奈子, 本田達志, 増山悦子, 中村健一, 熊野池における植物プランクトンとアルカリフォスファターゼの季節変化. 生命

[学会発表](計 3件)

増山悦子, 内藤佳奈子, 中村健一, 河口干潟に生息するスナガニ科の食性及び生息環境比較. 日本動物学会第85回大会, 2014年9月13日, 東北大学(仙台市)

田淵知奈, 坂本節子, 増山悦子, 中村健一, 内藤佳奈子, 広島湾における植物プランクトンとアルカリフォスファターゼの鉛直分布および季節変動. 日本プランクトン学会・日本ペントス学会合同大会, 2014年9月5日, 広島大学(東広島市)

橋本奈民子, 増山悦子, 坂本尾節子, 山口峰生, 中村健一, 内藤佳奈子, 広島湾におけるアルカリフォスファターゼの季節変動とその要因. 日本水産学会中国・四国支部例会 2013年11月17日, 宇和島市総合福祉センター

6. 研究組織

(1)研究代表者

増山 悦子 (MASUYAMA, Etsuko)

県立広島大学・人間文化学部・講師

研究者番号: 10084162