

発表番号

1-8

## 微生物の機能強化による水環境修復技術の確立のための戦略的基礎研究

研究代表者 筑波大学農林工学系 前川 孝昭

**Basic studies for remediation of the water environment by enrichment of microbial functions**

**Takaaki Maekawa, Research Director of CREST**

**Agricultural and Forest Engineering, University of Tsukuba**

### 1. 研究の概要

本研究は水域の窒素汚染問題に絞り、汚染水域の水環境修復を微生物の持つ機能の強化によって達成することを目的としている。微生物機能強化の手段として微生物の増殖を助けるために栄養塩、微量金属を常に微生物に供給する方法を開発した。その方法として包括固定した担体を作成し、この担体表面に微生物が高密度に棲息できる環境を作ることによって分解性が高められるかを検討した。このアイデアについて特許申請を国内外に出している。脱窒工程では有効な結果を得つつあり、炭素源の分解にも有効であった。また微生物群集の有機物分解機能を腐生連鎖の側面から検討した。今後これらを実際の環境の場で適用する研究を後半の2年間で確認する。

### 2. 現在までの中間成果報告

#### 2.1 研究内容の報告

##### a. 微生物機能強化のための誘導手法とその遺伝的固定化

##### a-1 中温メタン菌の冷温馴養過程の解析とその機能強化

中温メタン菌を5~15°Cの冷温で馴養するときに発生する細胞膜の変化の解析とその機能維持を図る方法についての検討を目的とする。これまでに、栄養塩包括担体(栄養塩包括濃度1000倍、担体充填率10%)を用いることにより、メタン菌濃度、メタン発生速度を増加することがヒントになっている。この傾向は低温域でもみられ北海道などの低温域におけるメタン発酵の実用化が期待されるので、140m<sup>3</sup>の在来型メタン発酵槽を10月より担体を入れない実験を立ち上げ70m<sup>3</sup>/d~120m<sup>3</sup>/dのバイオガスが無加温で発生している。12月、1月に入ってバイオガス発生量が低下している3月より、上記担体を投入して冬期のガス発生量の低下を防止しうるか実験を行う。

##### a-2 冷温メタン菌によるCO<sub>2</sub>固定能力と最適培地の関係

冷温メタン菌の微量金属塩、イオウ源、窒素源などの栄養源について検討する。微量金属塩濃度の最適化により、HRTが20日の時、従来のメタン発酵法と比べメタン生成速度が1.4倍、メタン菌体密度が1.6倍に高められた。またHRTの違いにより微量金属塩の効果が異なることがわかった。これらの知見を利用してバイオガス中のCO<sub>2</sub>を基質としたメタン発酵によるメタン菌密度の向上を狙ったメタネーション実験を実施中である。

### a-3 生物・物理・化学的因子の制御による微生物細胞の活性化・機能強化

各種微生物の浄化・分解の機能向上を強化するため、物理化学的因子との関係に着目した解析が重要であり、個々の微生物の活性がいかなる条件で高まるかの解明を目的とする。これまでに、細菌-輪虫からなるリアクター中に輪虫を高密度に定着させ、透視度 60 度以上の処理水を得ることができた。このとき、輪虫の迅速な定着化を図る上では処理槽内に充填する担体の種類や担体の孔径が重要な因子となることがわかった。また  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$  および BOD は輪虫 *P.erythrophthalma* の増殖に影響を及ぼす環境要因であり、Glucose、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  および  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  の添加量をコントロールし、オリザノール等を添加することにより *P.erythrophthalma* の増殖を促進させ得ることがわかった。この輪虫類の大量培養について検討をおこない、増殖速度、最大個体数密度および基質の入手のし易さ、コストの面から、米糠を用いて行うことが適切であると考えられた。大量培養を行った輪虫の、基質の不足による死滅を防ぐために、凍結保存法と乾燥保存法について検討を行い、生存率と実用性の面から、乾燥法が適当であると判断された。

### a-4 硝化・脱窒菌の遺伝子修飾による細胞機能強化

硝化・脱窒において有能な能力を持った微生物を選抜し、解析、機能強化を行う。また硝化・脱窒遺伝子の高発現や、他の有用微生物への導入を行い、実用に即した新規微生物の創製を目的とする。硝化機能の強化のためにはアンモニアモノオキシゲナーゼ(アンモニアの亜硝酸への酸化に関与する酵素)を検出する必要があるが、これまでに遺伝子的手法を用いて遺伝子の検索を行い、硝化についてはヒドロキシルアミンから亜硝酸および亜硝酸から硝酸への酸化のそれぞれに高活性を有する株が存在することが明らかとなった。これらの株の薬剤より、今後分子育種が可能であることもわかった。脱窒についてはセルロース担体をエネルギー源として利用しつつ浄化を行うというプロセスを目標とし、低温性セルロース分解菌および低温性脱窒菌の取得を試み、4°Cでの脱窒能およびセロビオースとグルコースの利用による脱窒が確認された。

## b.点源汚染の微生物による水環境修復技術の確立

### b-1 固定化硝化菌および脱窒菌による窒素源の硝化・脱窒速度の高効率化

多孔性担体で吸着固定化した微生物を用いて硝化・脱窒の高速度化を図り、淡水のみならず海水系排水および地下水からの小型・高性能な窒素除去プロセスを構築し、硝化・脱窒反応に伴っておこる  $\text{N}_2\text{O}$  発生の機構解明とその抑制手法を確立して、パイロットスケールの実証試験を行う。従来困難といわれていた海水系の高速度硝化・脱窒プロセスが構築され、海水系での硝化速度を向上させるためには起毛担体が適当であることがわかった。地下水の改質では、(1)汲み上げた地下水の飲料水としての改質および(2)地下水脈中での直接浄化を目的とした。(1)では 14°Cまで亜硝酸を蓄積することなく脱窒が行われたが、最大脱窒速度は 25°Cの3分の1程度であった。(2)では菌体の固定化および炭素源となる生分解性物質としてデンプンを用い、4°Cでの脱窒能力を示す2株が得られた。

### b-2 高度高温菌のスクリーニングによる固体有機物の高速分解

水環境修復技術とされるほとんどの水処理技術が必然的に発生する有機性汚泥をはじめ、

利用後の藻類や植物、固液分離によって分別した家畜ふん、ならびに農業および生活系から今後発生するであろう生分解性プラスチック等を好気環境下において高速分解する技術を構築することを目的とする。特に、高温環境下で活発な代謝機能を示す高熱(高温)性菌に着目し、高温分解過程にあるコンポスト化プロセス等、特殊な高温環境から機能性の高い菌をスクリーニングして分解プロセスに応用する。これまでに製作したコンポスト化実験装置の導入により、コンポスト化反応の初期過程をより短時間、かつ確実にし、反応中のサンプリングを容易に行えるようになり、中温分解過程と好温分解過程に関わる微生物の分別が可能になった。

#### b-3 腐生連鎖を組み込んだ微生物群集の有機物分解機能強化

本研究では特に有用な栄養塩レベルの微生物を選定し、効率の高い特定種で構成された微生物群集を創出し、これを水環境の浄化や修復に活用することを目的とする。腐生連鎖の上位に位置し細菌補食性の原生動物の捕食者である肉食性原生動物 *Dileptus anser* および腐性連鎖を通して硝化活性を高めている可能性のある *Arcella vulgaris* に着目し、生物学的特長および腐生解析における役割の解析を行った。*Dileptus anser* の最適培養温度、比増殖速度、補食する *Colpidium sp.* の個体数を求め、*Dileptus anser* が広食性であり腐生連鎖の有機物分解の向上に寄与するかが分かった。また *Arcella vulgaris* の増殖に最適な培養温度、汚泥細菌濃度、等を求め、比較的狭食性であり、腐性連鎖において硝化活性の強化に寄与することが明らかとなった。

#### b-4 光合成細胞による N, P 吸収機構の解析および高効率吸収システムの開発

本研究の目的は、高濃度の低級脂肪酸を光電子供与体として効率的に利用する光合成細胞をスクリーニングし、その細胞の N および P の吸収機構を解明すると共に、廃水中の N および P の除去システムを構築することである。これまでの研究結果より、*Chlorella*、*Rhodobacter* および *Spirulina* の混合系を利用した廃水処理は多量の有機物を含む廃水を希釈することなく効率的に除去する可能性が示唆された。また、*R. sphaeroides*、*C. sorokiniana* および *S. platensis* の混合系による廃水処理では、廃水の組成および濃度の大幅な変動に対しては *S. sphaeroides* および *C. sorokiniana* の混合割合及び接種の変化で対応できる事が示された。また、廃水中に残留する窒素およびリンは *S. platensis* で除去可能であるが、光条件を整える必要があることが分かった。

#### c. 生物間競争を利用した水環境修復技術

##### c-1 水環境修復用微生物機能強化混合培養システムの開発とその利用

生態系において失活し易い微生物の環境修復能力の安定化を図るために、環境修復に関わる微生物の混合培養系における微生物間の相互作用を解析し、理解するとともに、微生物間の相乗・阻害作用を積極的に利用した水環境修復微生物機能強化混合培養システムを開発する。作製したメンブランフィルター型混合培養解析装置およびホローファイバー型混合培養解析装置により 2 菌株および 3 菌株の混合培養中に行われる構成菌株のそれぞれの細胞増殖経過を別々に、リアルタイムで定量的に把握することが可能となり、構成菌株間の相互作用を解析することが可能となった。平成 9 年度は酵母と細菌のモデル混合培養系(2 菌株および

3 菌株)で実験を行い、装置が各細胞増殖経過を別々に定量でき、構成菌株間での相互作用を解析できることを確認した。平成 10 年度は自然界から分離した緑藻と細菌間による実験で、装置が相互作用の解析に有効であることを確認した。

#### c-2 競合を利用した増殖制御機構の解明

藍藻類と藻類の栄養塩競合を解析し、有害藻類の成長阻害を積極的に起こし、これによって汚染環境の修復の可能性を検討する。これまでに競合関係にある藻類 *M.novacekii* と *S.quadricauda* の栄養塩利用方式を理論的・実験的に検討し、得られた結果より数値シミュレーションを行った。また、*M.novacekii* と *S.quadricauda* の混合培養系での実験から、希釈率により優占種が変わることがわかった。希釈率が低い場合では *M.novacekii*、高い場合は *S.quadricauda* が優先し、これはシミュレーションで出された予測とも一致し、アオコが夏の水の停滞する水域で優先することの理論的裏付けになると考えられる。

#### c-3 固定化硝化・脱窒菌の生態系利用による環境修復

霞ヶ浦や利根川に流入する小河川の硝化・脱窒を促進するための河川構造物を考案し、その効果を評価する。平成 8,9 年度は積層網状体、多孔性コンクリートブロックおよび PVA 担体に包括固定した脱窒菌の水質浄化機能について研究を行った。NO<sub>3</sub>-N および NO<sub>2</sub>-N はそれぞれ 61% および 52% の平均除去率が得られた。BOD および COD はそれぞれ 44% および 60% の平均除去率が得られた。またここで処理効果が得られなかった NH<sub>3</sub>-N および PO<sub>4</sub>-P の物理・化学的除去法の確立を目的として実験室レベルでの基礎実験を行った。

#### c-4 生分解性樹脂の分解による硝化・脱窒菌の機能向上

汚染された地下水中の NO<sub>3</sub>-N の除去を目的とし、脱窒菌固定化担体による高 NO<sub>3</sub>-N 濃度廃水からの脱窒を行った。またリアクター中での気泡の閉塞を防ぐために、固定化脱窒担体にマグネタイトを含み磁界中で担体を揺動させ、連続処理を行った。この結果、固定床型 MBCR により、硝酸負荷が低濃度(14.49~43.4mg-N/l/h)程度の時、窒素除去率 99.5%、除去速度 14.49~43.1mg-N/l/h の高い処理成績が得られた。また高負荷条件(162mg-N/l/h)では除去率 67.8%、除去速度 110.5mg-N/l/h の処理成績が得られた。

## 2.2 発表論文等

①特願 平 9-140181②微量元素・無機栄養塩類拡散型菌体培養担体③嫌気性細菌等の培養では、微量金属や無機栄養塩等、微量元素の培地中への添加により、菌の増殖等が増加することがヒントになっている。この微量元素を徐放性のある固定化担体に混入し、この担体を培養液中に投入することにより、微量元素が培養液に徐々に放出され微生物の増殖を促進し廃水処理能力が強化される(国際特許申請)。

①特願 平 9-177269②微生物固定化磁性担体とその製造方法及び廃水処理法③微生物固定化磁性担体とその製造方法を確立した。外部からの磁力で磁性担体の動きを制御することにより、磁性担体の浮上や短絡化チャネリングを防ぐことができた。またこれによる廃水処理能力を評価した(国際特許申請)。

①日本水環境学会②有用微小動物輪虫類の大量定着と水質浄化に及ぼす付着担体の効果③微小後生動物輪虫類 *Philodina erythrophthalma* を4種類の担体を用いた担体流動方式の人工排水を基質とするモデルリアクターへ摂取し、担体への付着性水質浄化機能に果たす効果について調べた。輪虫の担体への付着性は、その表面・内部構造によって異なり、特に担体の孔径が輪虫の体長の約2倍程度である  $500\mu\text{m}$  であり、かつ担体内部まで輪虫が容易に入り込める構造になっているときに、多くの担体に付着できることが判った。処理水質については、輪虫が細菌を補食することにより、透視度およびSSに対して大きな除去効果が得られた。また、輪虫の補食により細菌類の個体数密度が減少することで、処理水中のDOCおよび栄養塩類濃度の増加が考えられたが、生菌数とDOCの関係から、細菌類の個体数密度によらずDOC、栄養塩類はほぼ一定であった。このことから、輪虫の定着により、処理水質に悪影響を与えることなく、懸濁物質のみを特異的に除去できることが明らかとなった。

①日本水処理生物学会②袋形動物輪虫類の増殖に及ぼす環境因子の影響③袋形動物門輪虫項に属する輪虫類は、生物処理施設においてしばしば大量に出現し、凝集体摂食者である環形動物貧毛類等との共存条件において、水質浄化能および発生活泥量の減量化に大きな役割を果たす有用微小動物である。本研究では、生物膜法の処理施設において最も出現頻度の高い輪虫類として *Philodina erythrophthalma*, *Totaria rotatoria*, *Lecane luna* に着目し、その生理・生態学的諸特性に関わる基礎的知見の集積をはかった。得られた結果は以下のように要約される。(1)至適温度は *P.erythrophthalma* および *R.rotatoria* では  $30^{\circ}\text{C}$ 、*L.luna* では  $25^{\circ}\text{C}$  である。(2)pHは、5~9の範囲では大きな影響はなく、特に *L.luna* では、pH4.2の強酸性条件でも増殖可能である。(3)塩濃度は、1/25Mまで増殖に影響はない。(4)食物源としての細菌の種類については、*P.erythrophthalma* および *R.rotatoria* では *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* など、系統保存施設から入手した供試細菌11種全てにおいて増殖可能である。(5)食物源としての汚泥濃度の影響は、Monod式の適用できる範囲で計算すると、*P.erythrophthalma*, *R.rotatoria*, *L.luna* で、それぞれ  $\mu_{\text{max}}$  は  $0.54\text{day}^{-1}$ ,  $0.50\text{day}^{-1}$ ,  $0.19\text{day}^{-1}$ ,  $K_s$  は  $24\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $27\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $23\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、である。(6)攪拌強度の影響については *P.erythrophthalma* および *R.rotatoria* では最大加速度  $0.9\text{G}$  の条件下でも増殖が可能であるが、*L.luna* では最大加速度が  $0.5\text{G}$  を越える条件で、増殖が完全に阻害される。

### 3. 今後の研究の方向

#### a. 微生物機能強化のための誘導手法とその遺伝的固定化

低温メタン菌によるメタン発酵では、ベンチスケールでの実験結果から、微量金属の添加や担体の使用により増殖速度やガス発生速度が増加できることが示された。現在、パイロットスケールへ規模を拡大し実証試験を行っており、今後実用規模での実証実験を実施する。

輪虫類による廃水の処理では、汚濁物質の分解、水の透明化がえられ、また大量培養のための手法(低コストの基質、輪虫の貯蔵法)が確立された。今後は実験室レベルで得られた結果をスケールアップするための検討を行っていく予定である。また、紫外線、電子線、磁場などの物理化学的な因子の付加による細胞の活性への影響を、各種パラメータを指標として検討していく。