

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

本研究で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た。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担体を開発した¹⁾。さらに、この担体表面に微生物を高密度に棲息できる環境を作り、窒素や炭素の汚染物質の分解性を高めることについて検討した。この方法を窒素汚染については茨城県江戸崎町小河川において実用化実験を行なった、後に中国雲南昆明市デン池流入河川においてスケールアップ実験を実施した。また、地下水においては米国ハワイ州ホノルル市の地下水において検討した。

2. 現在までの成果報告

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℃の冷温で馴養するとき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した。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できた。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、140m³の在来型メタン発酵槽を平成 10 年 10 月より担体を入れない実験を立ち上げ 400 頭分の豚糞尿を投入して 70m³/d~120m³/dのバイオガスを無加温で発生させた。12 月、1 月に入ってバイオガス発生量が低下したが 3 月より、上記担体を投入して冬期のガス発生の低下を防止した。また、この知見に基づき平成 11 年 12 月より 40m³の地下埋設型メタン発酵槽を設置し、このメタン発酵槽内に開発した栄養塩包括担体を用いて、40 頭分の牛乳糞を投入して 2 年間連続運転を可能にした²⁾。冷温で馴養したメタン菌の細胞膜の脂肪酸組成の変化がみられた。

a-2 冷温メタン菌による CO₂ 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した。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CO₂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した。さらに、栄養塩担体を導入することによって、CO₂/H₂メタン菌からビタミンB₁₂を従来法の80~100倍の生産性を向上させ、有望な副産物を生産しうるハイブリッドシステムの構築を可能にした^{3) 4)}。

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

本研究は合併浄化槽内の各種微生物の浄化・分解の機能向上を強化するため、細菌-輪虫からなる系を構成し、浄化槽内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処理槽内に充填する担体の種類や担体の孔径が重要な物理的因子となることがわかった。またNH₄-N、PO₄-PおよびBODは輪虫*P. erythrophthalma*の増殖に影響を及ぼす生物的・化学的要因であった。基礎実験的Glucose、NH₄ClおよびKH₂PO₄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。浄化槽に投入する輪虫類の大量培養では、増殖速度、最大個体数密度および基質の入手、コストの面から、米糠が適切であった。大量培養を行った輪虫の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した。改良した合併浄化槽の性能試験は平成13年度より浙江省太湖流域で検討する予定である。

a-4 硝化・脱窒菌の遺伝子修飾による細胞機能強化

- 1) 硝化：21種類の従属栄養性細菌の候補菌株の中に、それぞれの硝化関連遺伝子(アンモニア酸化酵素ヒドロキシルアミン酸化酵素)の存在の可能性が示唆された。特にNH-17株は、好気条件下において、亜硝酸から酸化と脱窒を行っていることが明らかになり、また、NH-17は*Burkholderia cepacia*と同定され、同菌株で硝化・脱窒能を有していることは初めての報告となる⁵⁾。安定同位体でラベルされた亜硝酸を用いて、これまでスクリーニングされた従属栄養性硝化細菌の候補株21株について、硝化・脱窒能について調べた結果、NH-14、NH-15が硝化能と共にN₂までの好気脱窒能を有していることが確認した。また、遺伝子導入の際のベクターとなれるプラスミドを保持した菌株も存在を確認し、さらに遺伝子導入系の開発に成功した。

また、NH-14、NH-15のN₂OからN₂への還元酵素遺伝子(nos遺伝子)をNH-17に組込むことで、単一菌株による好気条件下での亜硝酸、アンモニア、ヒドロキシルアミンからN₂への硝化脱窒という系の構築を検討した。

- 2) 脱窒：低温性脱窒菌および低温性セルロース分解菌のスクリーニングに成功した。低温性脱窒菌と低温性セルロース分解菌を用いて、セルロース担体に吸着させた低温での共生脱窒に成功した。これらの共生系で安定同位体を使用して

N₂までの完全脱窒が行われていることを確認した。

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 N₂O 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った。従来困難といわれていた海水系の高速度硝化・脱窒プロセスを構築した。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った。地下水の改質では、a. 汲み上げた地下水の飲料水としての改質および b. 地下水脈中での直接浄化を目的とした。a. では 14℃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℃の 3 分の 1 程度であった。b. 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℃での脱窒能力を示す 2 株が得られた⁶⁾。

a. については、本研究終了も茨城県鉾田町の地下水について実用化実験を実施する計画である。

b-2 高度好温菌のスクリーニングによる固体有機物の高速分解

本研究は平成 9 年度で研究目的が達成され、平成 10 年 4 月の領域シンポジウムで報告した。

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

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こが分かった。また *Arcella vulgaris* の増殖に最適な培養温度、汚泥細菌濃度等を調べ、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。この結果を踏まえて、2 槽曝気による *Arcella vulgaris* の集積および硝化処理促進効果および 2 槽の容積比を変化させ硝化能が最大となる条件や最大生息容存を用いた。前者の原生動物は細菌の生息密度を高め炭素源の分解を向上させた。後者は硝化細菌密度の向上に役立ち硝化速度を向上させた。

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

本研究は平成 9 年度で研究目的を達成し、その成果を C-1 に組み込み検討を続けることになった。

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と微生物間の相乗・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検討した。1) 寒天とヘチマ繊維体を組み合わせ、*Chlorella sorokiniana* および *Rhodobacter sphaeroides* を固定化した混合培養システムを用いて得られた合成家畜糞尿尿廃水の繰り返し回分処理した。この結果から、長時間酢酸、プロピオン酸、リン、アンモニア態窒素、および硝酸態窒素を同時にかつ効率的に除去することができることが明らかとなった。これらの菌株をヘチマ繊維体に固定化し実用性を確認した。2) 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。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。さらに、緑藻(*Chlorella*)は、好気条件下で、明および暗条件ともに良好な増殖を示すとともに、高濃度の酢酸、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および PO_4^{3-} において高速度でしかも高率の除去能を有しているが、プロピオン酸の除去能はほとんど有していないことが明らかとなっている。そこで、自然界でのクロレラとコンタミ菌の共生メカニズムを利用した新規混合培養システムの開発のための基礎情報を得る目的から、クロレラ(嫌気条件でも増殖はできないが死滅はしない)とプロピオン酸分解能を有するプロピオン酸分解菌(通性嫌気性菌)を混合し合成家畜糞尿尿廃水の処理を行った。その結果、クロレラとプロピオン酸分解菌を組み合わせることにより酢酸(代表炭素源として)およびプロピオン酸の除去が可能となった。

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した。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* が優占し、これはシミュレーションで算出された予測とも一致した。さらに、窒素源の供給の状態を一定量とバルス状に区別して供給した場合、前者では *M.novacekii*、後者では *S.quadricauda* が有利となった。

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、その効果を評価した。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 3 年間研究を行った。 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ 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。この知見を利用して中国雲南省昆明市デン池での河川の実験を行った。その結果、T-N、COD、T-P の除去率はそれぞれ 70%、65%、50%前後であった。この実験結果は、日本で実施した以上の結果を示し、建設コストが 1m 当たり、日本では 1 万円前後、中国では 2000 円前後で施工可能と考えられた。

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 $\text{NO}_3\text{-N}$ の除去を目的とし、脱窒菌固定化担体による高 $\text{NO}_3\text{-N}$ 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 (MBCR) 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⁷⁾。ホノルルの地下水についてセルロース系の担体による菌体包括法と栄養源および炭素源包括方脱窒実験の比較を行った。前者ではエタノール炭素源の供給する方法が欠点とされ、後者では炭素源の徐放制御を行っても、これらの担体の有効期間が 10 日以内前後であったので、コスト的な欠点が明らかになった。また、後者の方法は硝化工程には有効であったが、硝化時間を約 6 時間以内に短縮することができず、微生物処理の制限が見えた。そのために $\text{NH}_4\text{-N}$ ならびに $\text{PO}_4\text{-P}$ などを効果的に除去できる電気化学的方法の基礎実験を行った。高周波パルス電圧を 200v/cm 以上、周波数 1KHz~50KHz とし、陽極電極に遷移金属酸化物を配設することによって、これらの $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{PO}_4\text{-P}$ は 80~90%、HRT30 分程度で除去できることが判った。この結果は本研究題目から逸脱したものと言え、派生した研究成果として位置づけ、今後実用化を目指して研究を続ける予定である。

2.2 発表論文等

- 1) 前川孝昭：①特願 平 9-140181、特開平 10-327850(国内)、EP0881287A2 (英仏独)、CN1203273A (中国)、②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分かった。この微量元素を徐放性のある固定化担体に混入し、これを培養液中に添加することにより、微量元素が徐々に放出され増殖や廃水処理性能が強化される。
- 2) Nobuyuki Ito, Takeo Inoue, Ikko Ihara and Takaaki Maekawa:①The XIV memorial CIGR world congress 2000, November 28th December 1st、②The Treatment of Livestock Manure with Non-heating Methane Fermentation Setup in Cold Region 「寒冷地における非加温メタン発酵システムの家畜糞尿処理」、③寒冷地向け 2 相式メタン発酵装置を北海道別海町に半地下型で構築した。隣接する牛舎から排出される 40 頭分の糞尿を投入原料とし運転を行った。発酵槽を覆った断熱材と盛土による断熱効果と酸化槽を曝気によって温度管理することにより、メタン発酵槽を冬期においてもガス生成に必要な 20°C 以上に保つことが可能であった。低温で馴養されたメタン菌を固定さ

れた栄養要素の拡散型担体を発酵槽に添加することにより、発酵槽の性能が改善された。

- 3) Zhenya Zhang, Yingnan Yang, Jun Lu, Takaaki Maekawa : ①2001 ASAE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING、July 30th August 1st、2001-SACRAMENTO, CALIFORNIA②Novel Vitamin B-12 Production System By Using CO₂ Fixation Methanogens「CO₂ 資化メタン菌による新規な B₁₂ 生産システム」、③ビタミン B-12 はバイオリアクタの重要な因子であり、医薬および飼料によく使われている。糖を含む培養液にプロピオン資化菌を培養してビタミン B-12 を生産している現状である。本研究では、ビタミン B-12 を馴養されたメタン菌の培養液から抽出して定量した。メタン菌は H₂/CO₂ 資化性馴養メタン菌を用いた。37°Cで加圧培養試験管を用いて振盪培養 (150 回往復/min) より行った。培養液を遠心分離器にかけ、上澄液を XDA-2 樹脂を充填するカラムを通過させ、蒸留水で脱塩し、最後、メタノール水溶液で、ビタミン B₁₂ の類似体をシアン化させながら溶脱させる。溶脱液は HPLC で定量分析を行った。培養液に高濃度ビタミン B-12 が 5 mg/g-dry 検出された。
- 4) 前川孝昭、張振亜 : ①特願 2000-24490(国内)、②水素資化メタン菌からのビタミン B₁₂ の生産方法、③CO₂/H₂ 資化性馴養メタン菌を、微量金属塩の無機栄養塩包括担体に固定させると共に限外濾過膜の併用及び Co/Fe 比の最適化によって、高密度メタン菌の培養、高速度の石炭ガスとバイオガスの改質および高効率のビタミン B₁₂ 生産技術が得られた。ビタミン B₁₂ の回収は従来の菌体からの回収に比べ非常に簡素化され、ビタミン B₁₂ 濃度もプロピオン酸菌にくらべ 50~100 倍となり、メタノール資化菌(長井史郎: 1996、生物工学会誌 74 (6)、447-455) からの回収の 2~10 倍に達成し、ビタミン B₁₂ の精製コストを極めて低くできる。
- 5) 中原忠篤、神戸敏明、野村暢彦 : ①特願 2000-267617、②新規微生物及び微生物による亜硝酸の除去、③好気条件で亜硝酸を酸化および還元反応により効率的に除去できるブルクホルデリア セパシア NH-17(*Burkholderia cepacia* NH-17)に属する新規微生物を提供する。新規微生物酵素反応を利用して、好気、嫌気条件下で効率よく高濃度の亜硝酸を分解できるため、汚水処理の効率化および高速化が見込める。
- 6) 松村正利、Fidel Rey P. Nayve JR : ①特願 2000 - 85416、②澱粉由来生分解性プラスチックを炭素源及び菌体固定化担体とする硝酸汚染地下水の直接浄化方法、③澱粉を単一炭素源とし、重金属非要求性の低温脱窒菌を澱粉由来生分解性プラスチックに固定化して硝酸汚染地下水を直接浄化する方法。
- 7) 前川孝昭、黒島光昭 : ①特願 平 9-177269、特開平 11-18765(国内)、特許番号 6043068 (米国)、公開番号 EP0889124 (英仏独)、公開番号 CN1204625 (中国)、②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処理能力を評価した。