

詳細説明

III 成果

IV 実用化の見通し

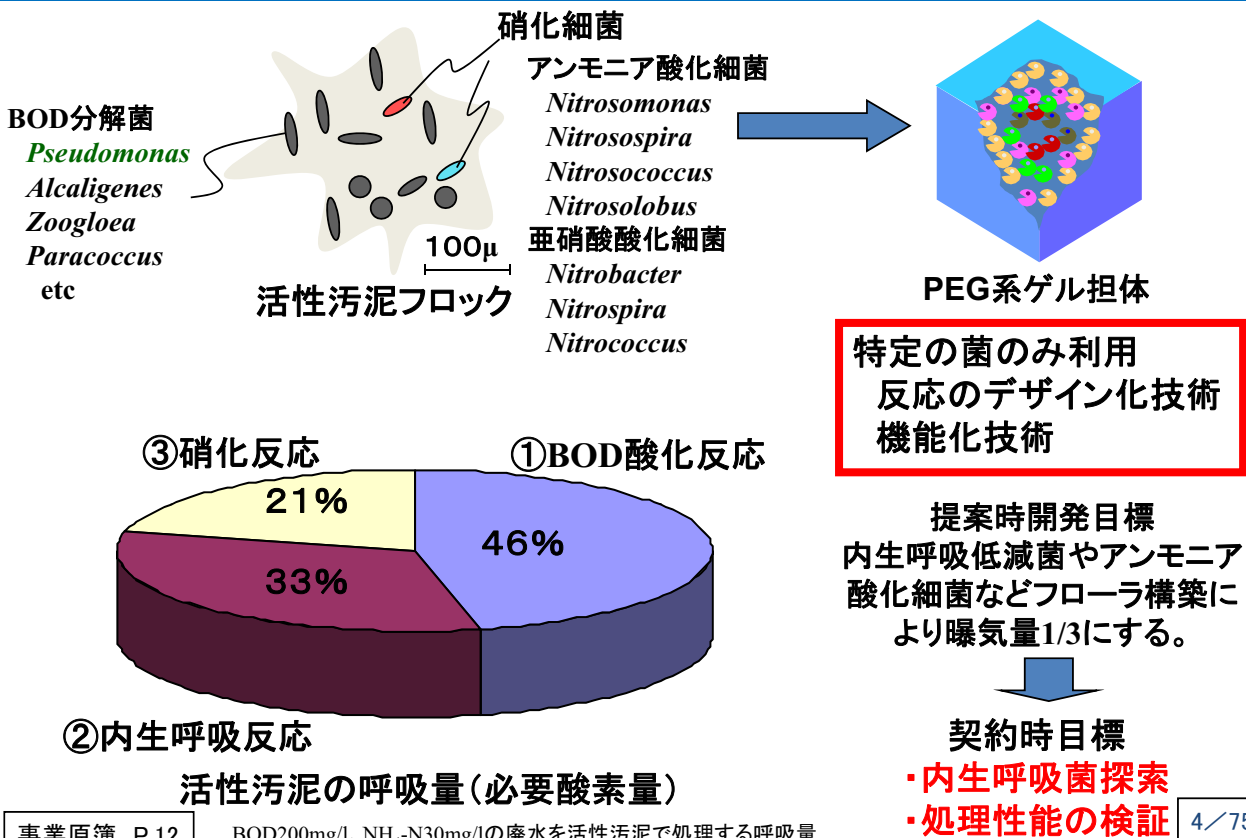
①好気性処理

日立プラントテクノロジー

3/75

好気

開発概要(従来の課題と本技術の新規性)



開発目標(最終目標)

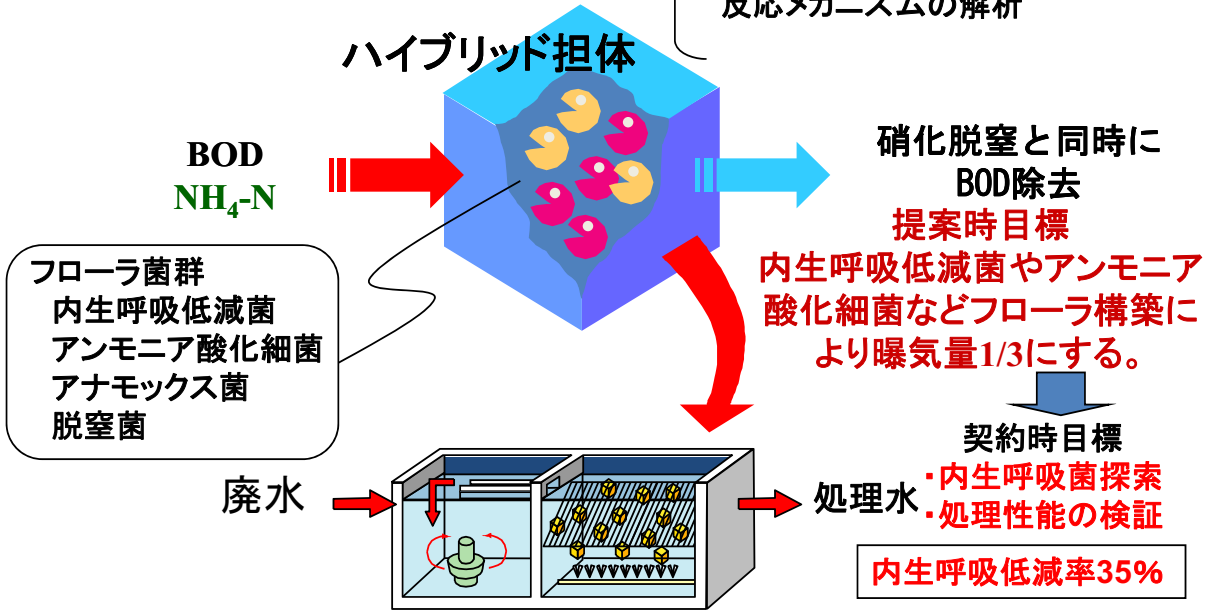
フローラの構築と処理性能の実証
日立プラントテクノロジー

有用菌の包括固定化方法
担体製造、コンタミ系での維持方法
装置の製作、処理性能の検証

フローラ内部の細菌の相互作用解析

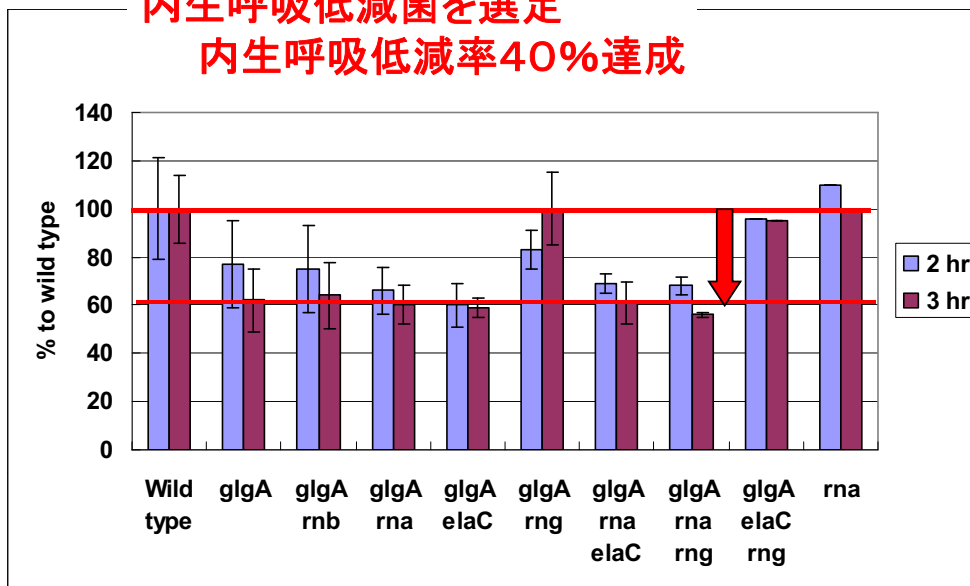
中央大学

内生呼吸低減菌の探索
安定同位体トレーサを用いた
反応メカニズムの解析



研究開発の成果①

内生呼吸低減菌を選定
内生呼吸低減率40%達成



glgA: グリコーゲン合成欠損
rnb, rna, elaC, rng: それぞれ異なるRNasesが欠損

- リン酸buffer中で、大腸菌を2および3時間インキュベーション後、内生呼吸率を測定
- 内生呼吸率は実験ごとの変動が多いので、Wild-type株に対しては、50回以上独立な測定を実施した
- 突然変異株に対しては5-20回の測定を実施 (glgA elaC rngおよびrna株については2回のみ)

研究開発の成果②

酸素の有効消費効率: $E = (\text{外生呼吸}) / (\text{外生呼吸} + \text{内生呼吸})$

$$E = X_{\min} \times [(1 + y) \times r_1] / [(X_{\min} \times r_1) + (X \times r_2)]$$

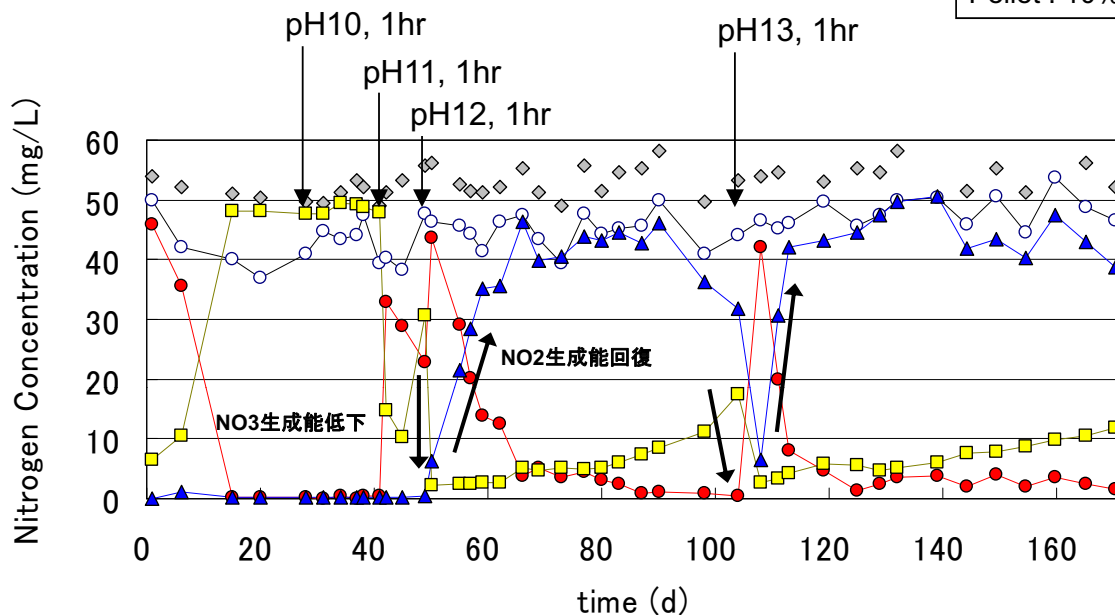
ここで、 y は増殖収率、 r_1 は外生呼吸率、 r_2 は内生呼吸率、 X_{\min} は排水処理に最小限必要なバイオマス量、 X は現存バイオマス量である。

- 活性汚泥等より約200株を分離。重複を排した**30株**について、酸素有効消費効率を測定。
- 活性汚泥中には、酸素有効消費効率が異なるさまざまな菌が生息する。
- 内生呼吸の高い菌が多数存在し、それが活性汚泥の酸素有効消費効率を下けているものと考えられる。
- 酸素有効消費効率が良いものはGamma-Proteobacteria。
- これらを包括固定化すれば、酸素有効消費効率は約2倍上昇し、内生呼吸は9割近く減少させることが可能であろう。

研究開発の成果③

担体をアルカリ洗浄→亜硝酸酸化細菌を排除
(不要な細菌の排除技術を確立)

HRT : 3hr
Temp. : 20°C
Pellet : 10%(v/v)



○ Inf. NH4-N ◇ Inf. T-N ● Eff. NH4-N ▲ Eff. NO2-N ■ Eff. NO3-N

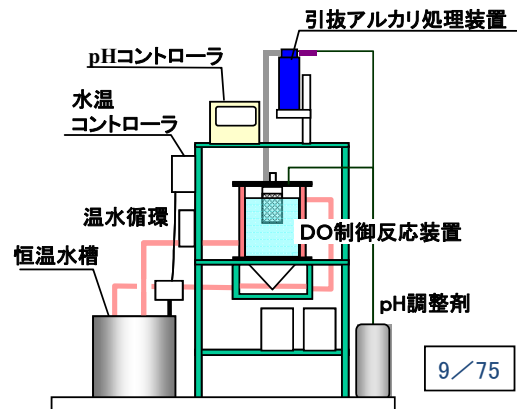
中間目標の達成度、課題と対策

中間目標の達成度

検討課題	得られた結果
有用菌の安定保持方法の検討	固定化材料分子量4,000プレポリマーを選定 担体アルカリ処理によるコンタミ防止。 亜硝酸型硝化技術を開発。
内生呼吸計測方法の検討	¹³ C培養菌体による高度な 内生呼吸定量方法を確立
内生呼吸低減菌の探索	低内生呼吸菌を活性汚泥より分離 遺伝的改変による内生呼吸を低減を達成 低内生呼吸菌を包括固定化することにより、 内生呼吸を大幅に低減できると思われる。

課題と対策

- 担体引抜アルカリ処理性能の評価
- 有機性廃水、実廃水でのコンタミ防止効果の評価
- BOD処理性能の評価
- 必要酸素量低減効果の評価



中間目標(基本計画の値)の達成度

1000m³/日、BOD200mg/L、NH₄-N30mg/Lでの必要酸素量

	プロセス	曝気量	開発課題
従来技術 活性汚泥法		100	—
従来技術 循環変法		80	—
NEDO 新技術 中間成果		74	低濃度アンモニアでの亜硝酸型維持
NEDO 新技術 最終成果		32	担体内部の菌の配置濃度、密度

名古屋工業大学

11 / 75

好気

開発概要(従来の課題と本技術の新規性)

従来 『グリーストラップ』: レストラン・食堂等の厨房排水に含まれる油分を分離する装置



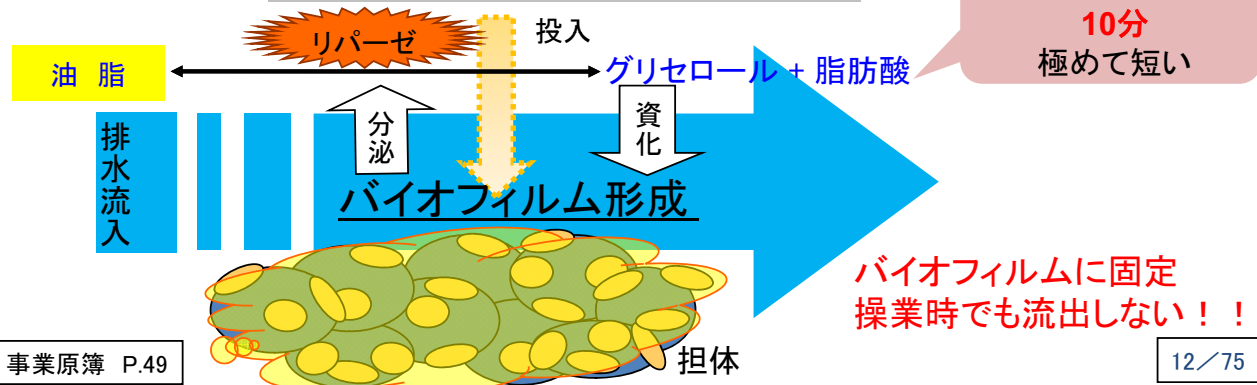
(名工大生協のグリーストラップ)

- ・容量以上の油分がすぐに蓄積、
清掃・回収頻度が増加
- ・酷い悪臭・汚れ、清掃・回収が大変
(不衛生な環境なので、敬遠される作業)
- ・放置すると、害虫の発生源や配管詰まりの原因
- ・清掃業者に依頼すると莫大な費用が必要

油分を槽内で消滅させる技術が切望

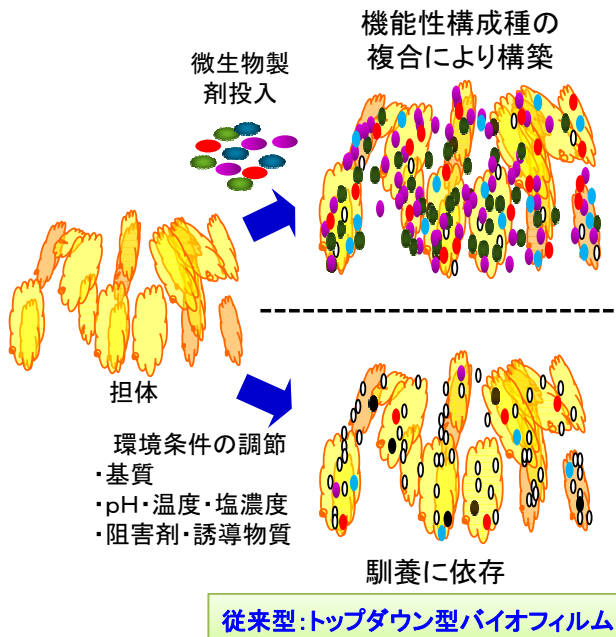
本技術

微生物製剤(油脂分解菌など)による構築と制御



開発目標(最終目標)

ボトムアップ型バイオフィーム: 新型バイオフィーム(新規の概念、世界初!!)



- 優位性
- ・迅速な構築
 - ・目的微生物のポピュレーションが高い
 - ・排水種に応じた制御
 - ・変動に対する迅速対応

- ①残存油脂濃度値
100mg/L以下
- ②微生物活性を半年間維持する製剤化技術の開発
- ③油脂分解菌が優占化する技術の開発

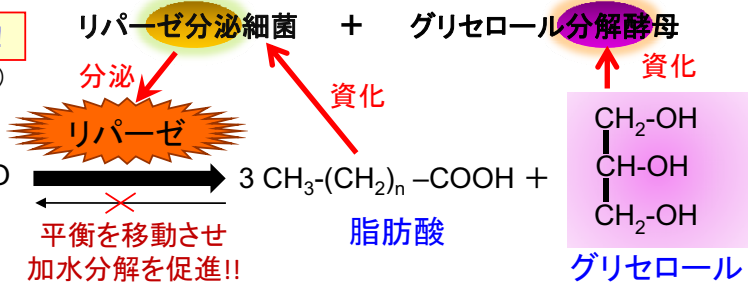
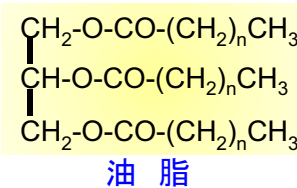
活性汚泥法の曝気プロセスの3倍の高効率化とエネルギー使用量の2/3の削減

研究開発の成果①

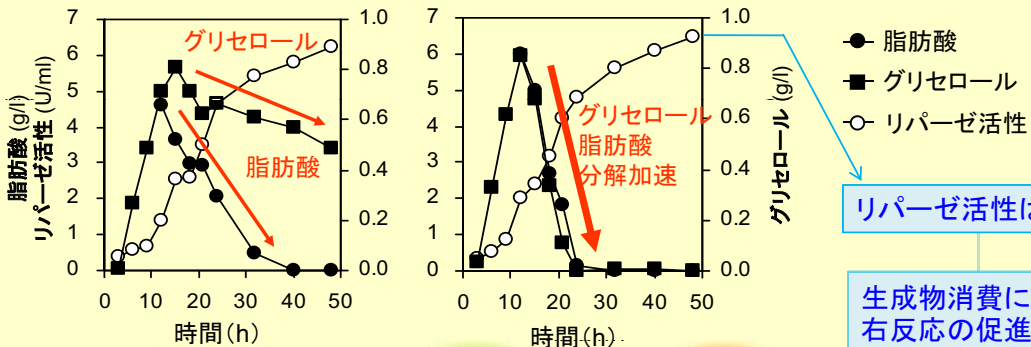
油脂分解微生物製剤の開発

機能の異なる微生物を複合化!!

(特願2009-79299)



オンサイト(グリーストラップ内)の条件下で効果を発揮できる微生物製剤を開発!! (特願2009-79432)

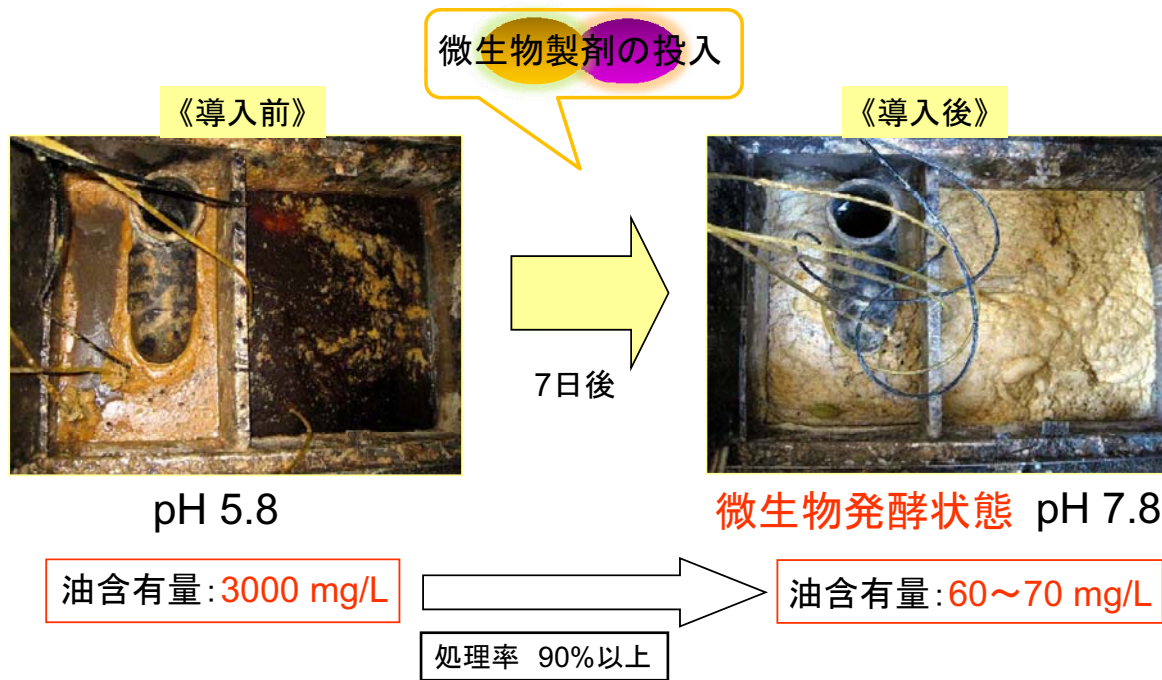


リパーゼ分泌細菌 リパーゼ分泌細菌+グリセロール分解酵母

《グリーストラップ条件下 (pH6)、含植物油3Lファーメンター培養》

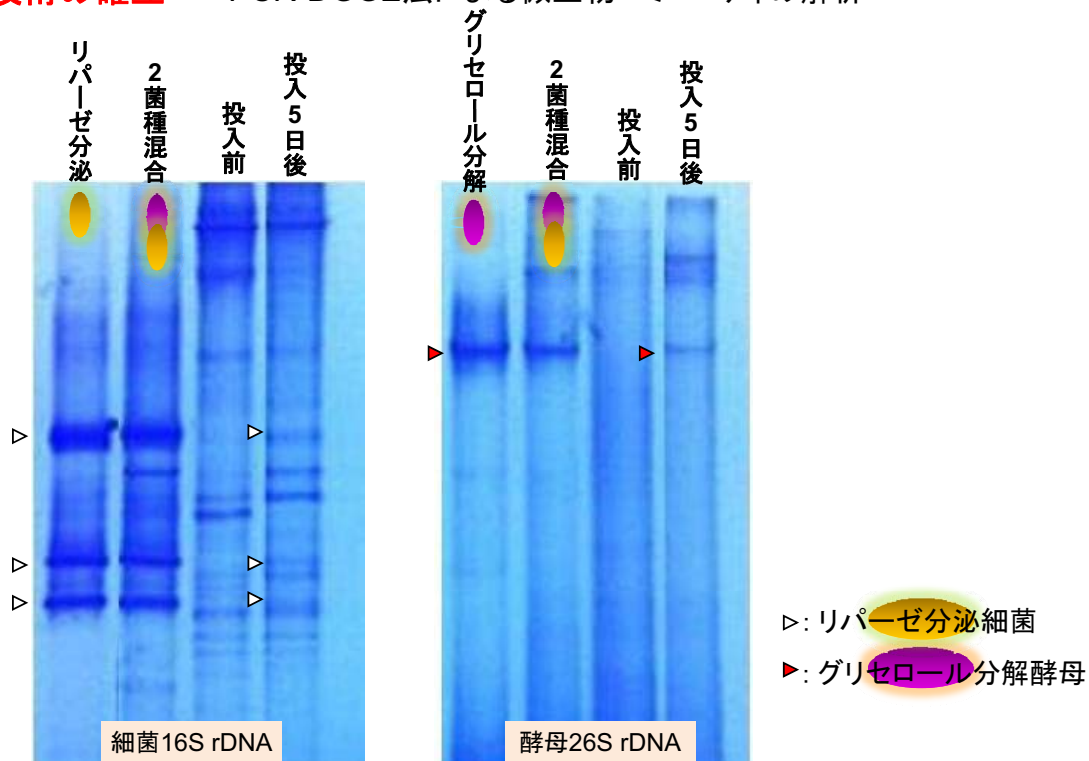
研究開発の成果②

実証試験の実施 名工大大学生協グリーストラップにて



研究開発の成果③

品質管理技術の確立 PCR-DGGE法による微生物コミュニティの解析

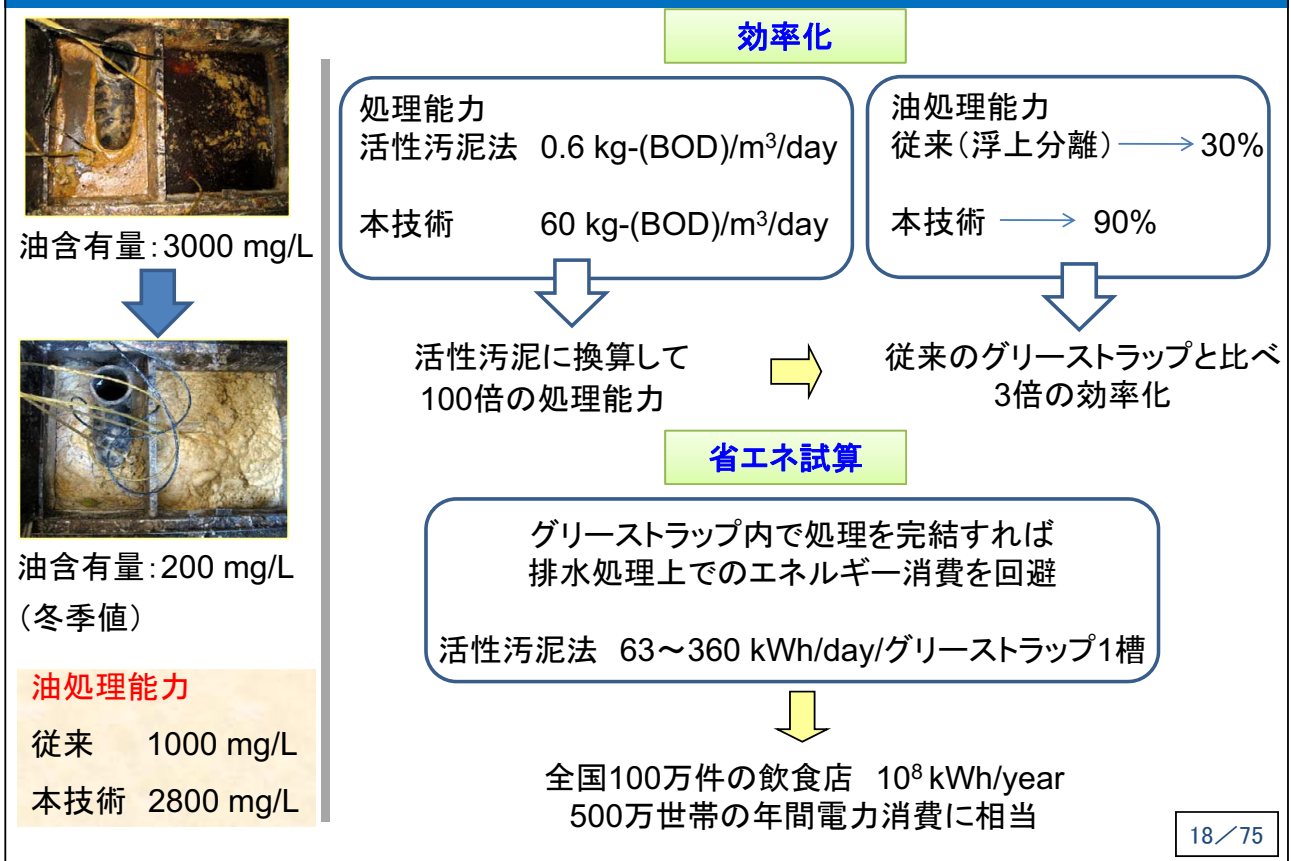


微生物製剤の定着を確認＝短い滞留時間でも流出せず

中間目標の達成度、課題と対策

従来	中間評価までの達成度	最終評価までの見込み
<p>①流入油脂濃度値 3000 mg/L～10000 mg/L ・大学生協のグリーストラップの値</p> <p>②グリーストラップ処理能力 1000 mg/L ・残存油脂濃度:2000～7000 mg/L</p> <p>③市販微生物製剤の性能 ・グリーストラップの環境であるpH6での活性が低い ・pHを調整しさらにバイオフィームを利用すれば残存油脂濃度400 mg/L</p>	<p>①残存油脂濃度値 200mg/L以下(目標達成)</p> <p>②油脂分解菌を3種類以上単離(ほぼ目標達成) ・グリーストラップの環境下で高活性の微生物製剤の開発に成功</p> <p>③微生物活性を3ヶ月間維持する製剤技術(75%達成) ・1ヶ月間は活性を保持。3ヶ月では1%ほどの生存率。これを10%に引き上げる</p> <p>④ポピュレーション解析技術(目標達成) ・PCR-DGGE法の適用</p> <p>⑤複合微生物製剤の開発(目標達成) ・共生微生物を利用した新技術を開発</p>	<p>①残存油脂濃度値 100mg/L以下 ・自治体の排出目標値は30mg/L ・中間で60mg/Lを達成。課題は冬季(200mg/L)</p> <p>②微生物活性を半年間維持する製剤化技術の開発 ・添加剤の検討</p> <p>③油脂分解菌が優占化する技術の開発 ・付着により微生物がグリーストラップ内に残存する技術を開発</p>
<p>高効率油脂分解菌を発見 微生物製剤の品質管理技術を確立</p>		<p>複合微生物製剤の改良 バイオフィーム制御技術の高度化</p>

中間目標(基本計画の値)の達成度

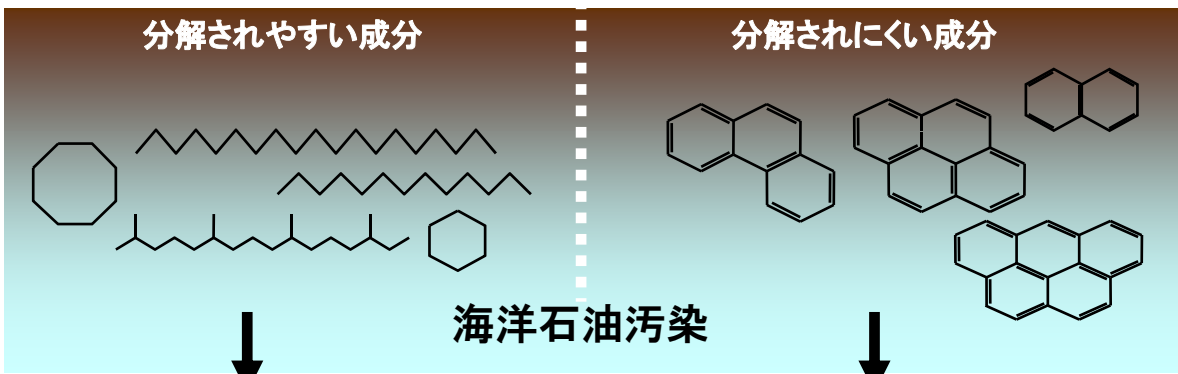


日本大学

好気

開発概要(従来の課題と本技術の新規性)

千種以上の炭化水素の集合体と複合微生物系



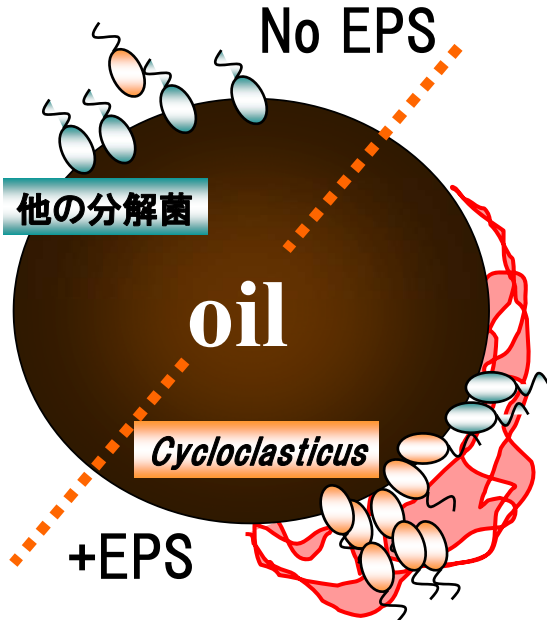
従来法	<i>Alcanivorax</i> 属細菌	主要分解菌	<i>Cycloclasticus</i> 属細菌
無機塩類などの投与による微生物の活性化	2日～1週間ぐらいで優占化に至る	優占化至るまでの期間	20日～2ヶ月である程度主要な群集となる
	数日～2週間ぐらいで大部分が分解	分解に要する期間	一부분解されるが多くの高分子のものは残留

微生物群集構造を変化させ、多環芳香族炭化水素(PAHs)を短期間で分解させる技術開発が望まれる。

- *Cycloclasticus*属細菌のデザイン化技術
- *Rhodococcus*由来の細胞外多糖(S-2 EPS)の利用

開発目標(最終目標)

EPSの投与→ *Cycloclasticus*の優占化
 →PAHsの分解促進
 (本研究開発にて)
 →理由を解明→代替手段の開発



理由の仮説
 これまでに得られたゲノム情報、EPSの化学構造などから、S-2EPSの投与による分解促進機構は、**S-2EPSが石油表面に局所環境をつくり、分解菌群に棲みかを与え、また、鉄などのPAHsの分解に必須な微量元素の濃度を局所的に高めることで、結果として、最もPAHsの分解に優れている *Cycloclasticus*が優占化し、PAHs分解が促進される、と考えられた。**

中間目標
Cycloclasticus がS-2EPSの投与により複合微生物群集の中で、**短期間で優占化し、PAHsの分解が3倍以上促進される理由を明らかにする。**

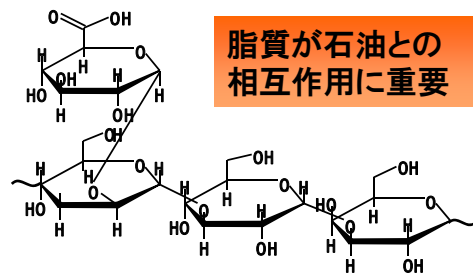
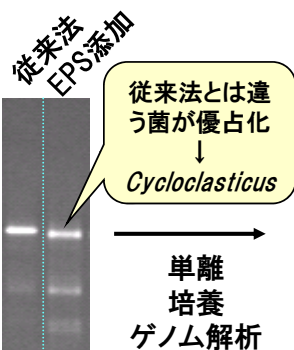
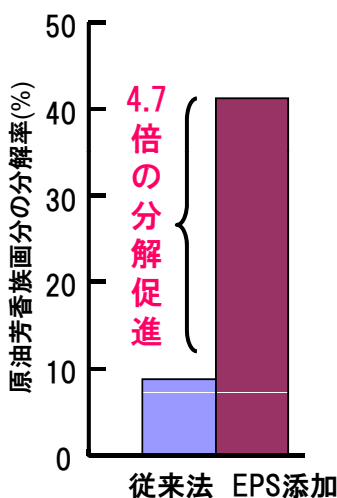
最終目標
 その情報に基づいたバイオリメディエーションなど**産業技術として展開可能な代替手段(物質、培養条件、人工共生系など)を開発する。**

研究開発の成果①

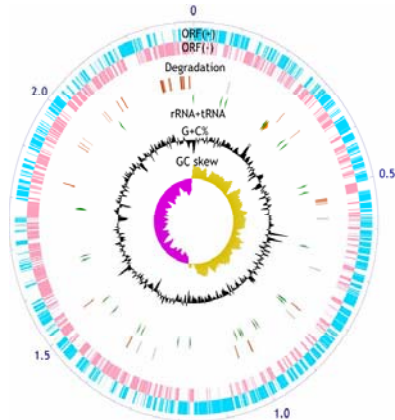
先行研究による成果

Cycloclasticus の培養制御の支持体として見出された**S-2EPS**は、GlcA-Man-Glc-Galの繰り返し構造を有する酸性多糖であり、分子内にスアリン酸とパルミチン酸を含む**ポリフィリックな構造**を有している。

海洋複合微生物群の原油芳香族画分(10000 ppm)の分解に対するS-2EPSの影響



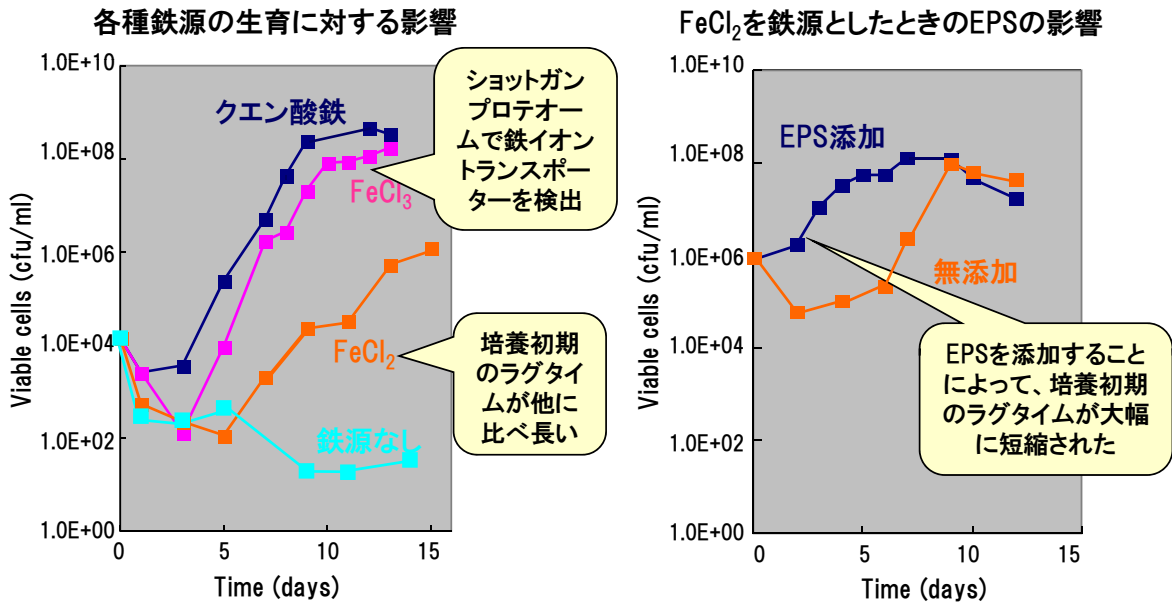
脂質が石油との相互作用に重要



これらの複合的な研究の結果、(前スライドの)仮説を導き出した。

研究開発の成果②

【検討項目】微量元素の獲得に関する検討 → *Cycloclasticus*の生育に対する鉄源の影響

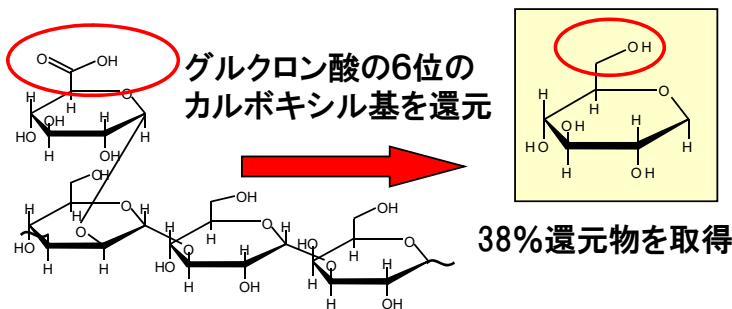


ゲノム情報からは、*Cycloclasticus* は有機鉄しか利用できないと考えられたが、今回の結果から、無機鉄も利用できることが明らかとなり、さらに、新しく鉄に関するトランスポーターも見出された。また、EPSが培養初期にFeCl₂の利用をサポートしていることが示唆された。

→EPSが鉄の局所的高濃度化に関与

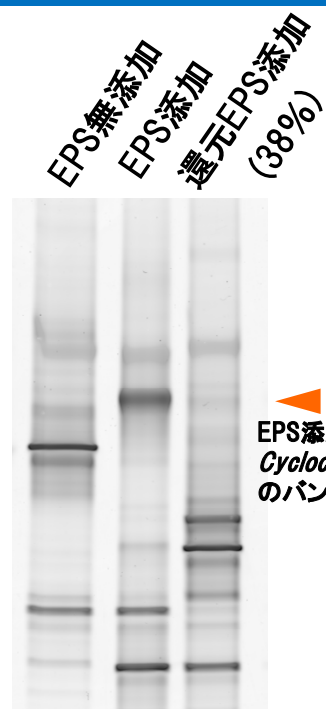
研究開発の成果③

【検討項目】基質への吸着と安定した生育の場の確保 → S-2 EPSのカルボキシル基が複合微生物系内での *Cycloclasticus*の優占化に与える影響



フェナントレン(phn, 10000 ppm)とヘキサデカン炭素源とした複合培養系での群集構造変化をDGGEで解析した。その結果、EPS無添加条件では同菌の優占化は確認できず、phnの分解率も6.9%と低かったが、EPSの添加により優占化の抑制が解除され(矢印)、分解率も36.1%と約5.2倍上昇した。

一方で、EPSの還元処理により *Cycloclasticus*の優占化は抑制された。



・ *Cycloclasticus*の優占化にはS-2 EPSのカルボキシル基が重要
・ 鉄の局所的な高濃度化に関与?

中間目標の達成度、課題と対策

従来

従来法による原油芳香族画分の分解率8.8%



当グループの先行研究

S-2 EPSの投与により、原油芳香族画分の分解率を41.2%まで上昇

従来法より4.7倍の促進効果
優占化に至るまでの期間を最短3.5日に短縮

中間目標

①PAHsの分解の3倍効果
→分解率41.2%で従来法の約5倍を既に達成済み

②S-2 EPSの重要な部分構造と機能を解明する
→カルボキシル基、脂質の重要性と機能を解明、ほぼ目標達成

最終目標

①新規培養支持体の開発
→S-2 EPS、市販の多糖類等の修飾、改変による機能強化
②新規培養条件の開発
→鉄源の種類、供給法等の検討による機能強化
③人工共生系の開発
→EPS生産菌などとの共培養による機能強化

S-2 EPSにより促進される理由を解明

これまでの情報を基にした代替手段の開発

中間目標(基本計画の値)の達成度

技術面での見通し

*Cycloclasticus*の培養支持体の部分構造と機能を解明した。

3倍の効率化

- ・優占化に至るまでの期間
20日～2ヶ月 → **最短3.5日 5.7倍**
- ・分解性(10000 ppm、2週間、複合培養系)
原油芳香族画分
8.8% → **41.2% 4.7倍**
フェナントレン(+ヘキサデカン)
6.9% → **36.1% 5.2倍**

②好気嫌気処理

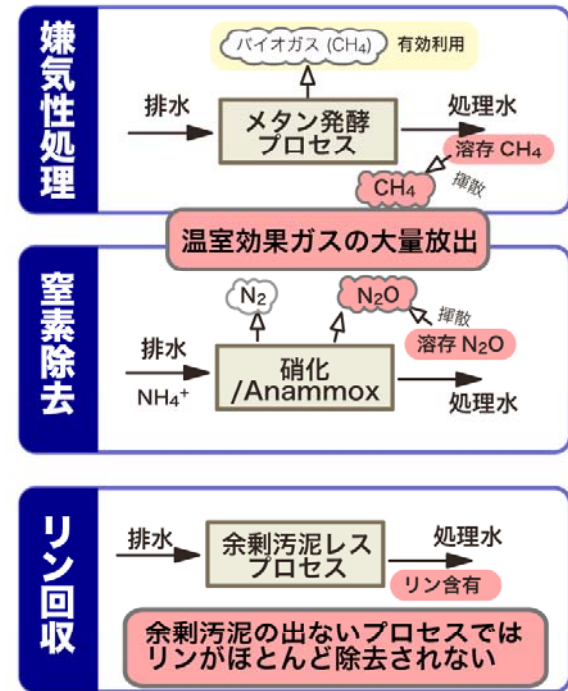
27 / 75

広島大学

28 / 75

開発概要(従来の課題と本技術の新規性)

既存の排水処理プロセスの課題

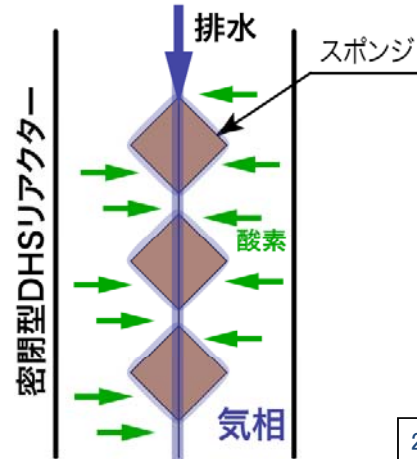


事業原簿 P.75

密閉型DHSリアクターの利点

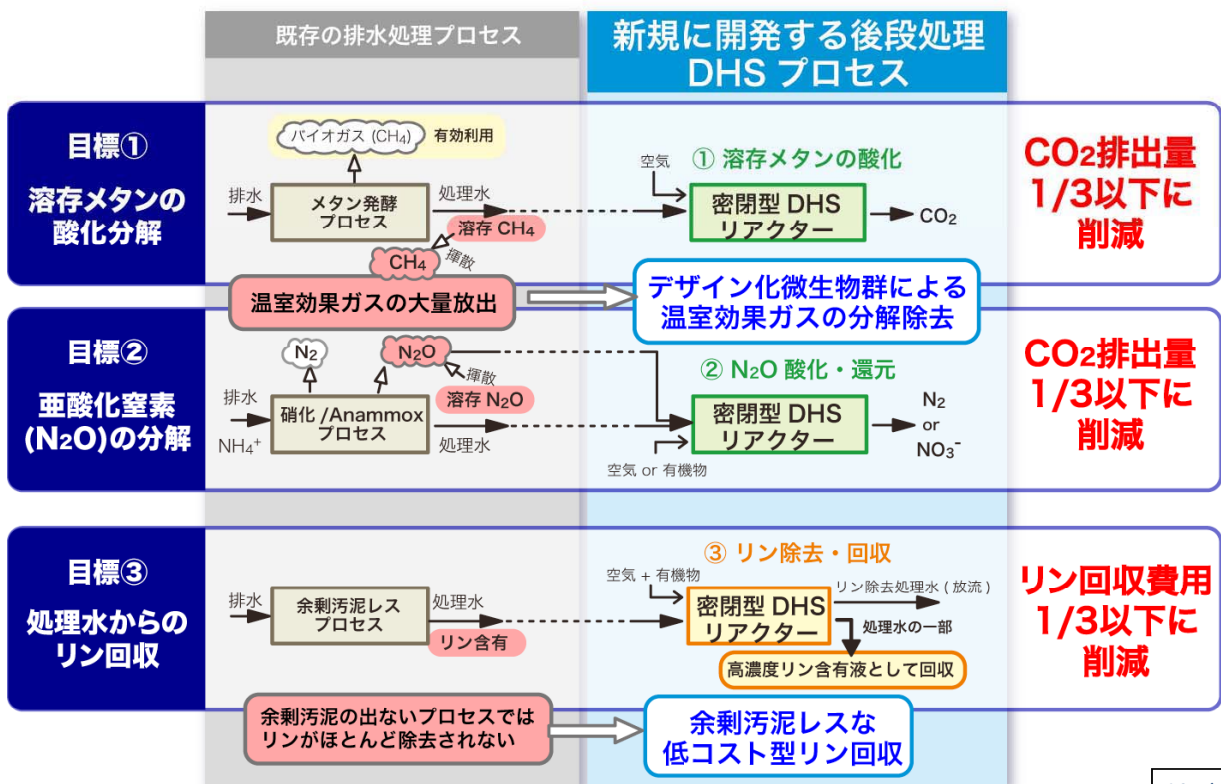
微生物の生育環境を空気供給(送風)のコントロールで好気・嫌気などに自由にデザインできる

↓
処理対象にあわせた最適な微生物叢をデザイン化できる



29 / 75

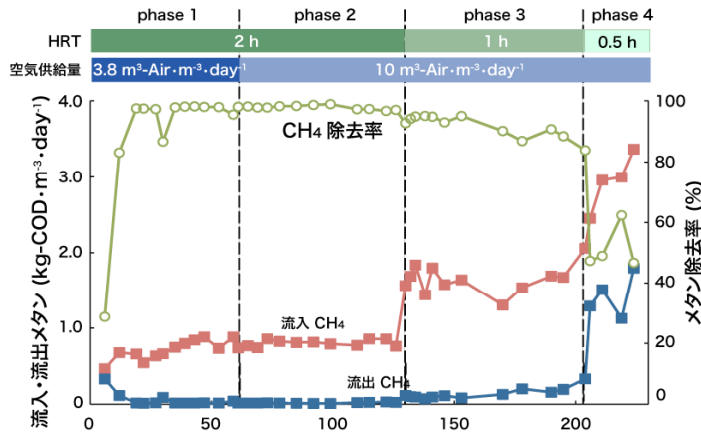
開発目標(最終目標)



30 / 75

研究開発の成果①

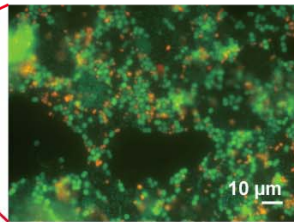
人工排水を用いた溶存メタン酸化分解実験



メタン酸化細菌をDHS
リアクター内に優占化



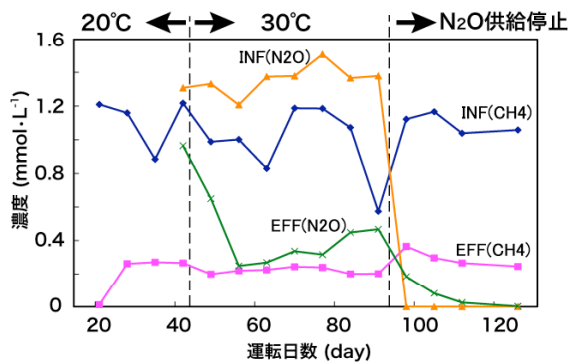
HRT 1時間、メタン負荷
 $2 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$
メタン除去率90%以上
を達成



赤：全細菌 (EUB338)
緑：メタン酸化細菌 (Gm705)

研究開発の成果②

メタンを炭素源とした亜酸化窒素(N_2O)の分解(脱室)

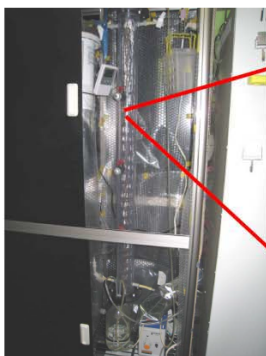


- 微生物の増殖と亜酸化窒素の減少を確認
 N_2O 除去速度 $0.14 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$



将来的には、メタン酸化DHSと統合し、
単一リアクターで温室効果ガスを除去

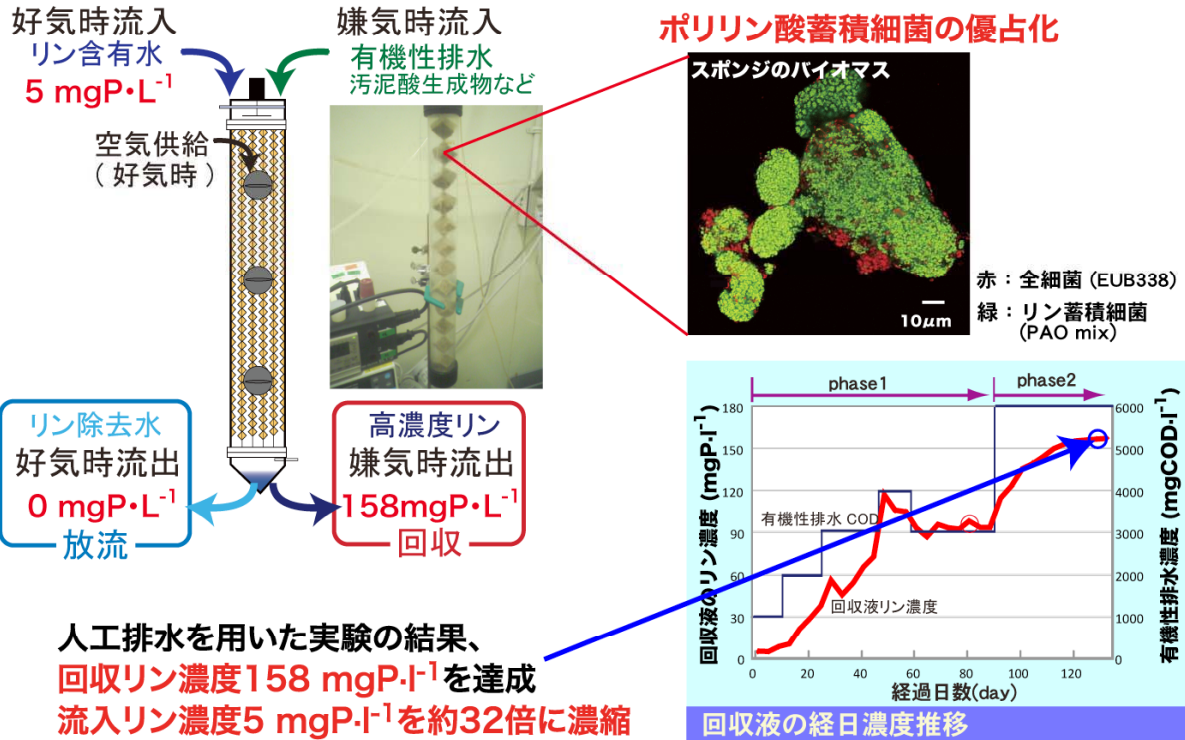
- 今後は微生物を解析し、
亜酸化窒素分解菌を特定する
- 亜酸化窒素の酸化分解処理も検討中



DHSリアクターの
スポンジの様子

研究開発の成果③

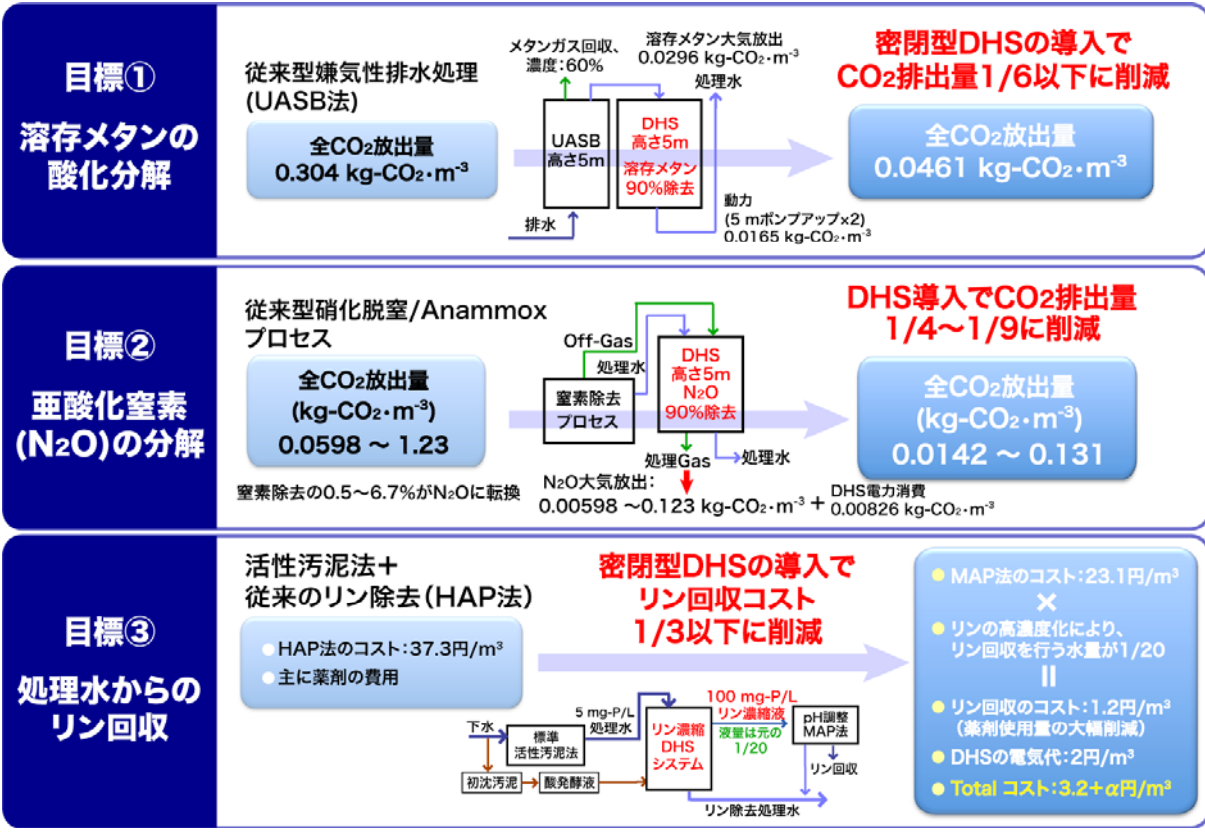
密閉型DHSによる新規なリン回収(特願2009-044797)



中間目標の達成度、課題と対策

従来	中間目標	最終目標
従来型嫌気性処理による CO ₂ 排出量: $0.304 \text{ kg}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-3}$ 算出根拠: 事業原簿2.6.2.4参照	人工排水中の溶存 メタン90%以上除去 CO ₂ 排出量80% 以上削減可能	実排水で実証 CO ₂ 排出量1/6に削減 $0.046 \text{ kg}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-3}$ 算出根拠: 事業原簿2.6.2.4参照
従来型硝化・anammoxによ るCO ₂ 排出量: $0.06\text{--}1.23 \text{ kg}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-3}$ 算出根拠: 事業原簿2.6.3.4参照	DHSリアクターで N ₂ Oの分解を確認 分解速度 $0.14 \text{ kg}\cdot\text{N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ を達成	N ₂ Oを90%以上分解 CO ₂ 排出量1/4に削減 $0.014\text{--}0.13 \text{ kg}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-3}$ 算出根拠: 事業原簿2.6.3.4参照
活性汚泥法+従来法に よるリン回収コスト $37.3 \text{ ¥}\cdot\text{m}^{-3}$ 算出根拠: HAP法による回収の場合 事業原簿2.6.4.4参照	人工排水を用いてリン を100 mg·l ⁻¹ 以上(元の 20倍以上)に濃縮 処理水量削減による リン回収コストの削減	実排水で実証 リン回収コスト1/3 以下に削減 $3.2 \text{ ¥}\cdot\text{m}^{-3}$ 算出根拠: 特願2009-044797 事業原簿2.6.4.4参照

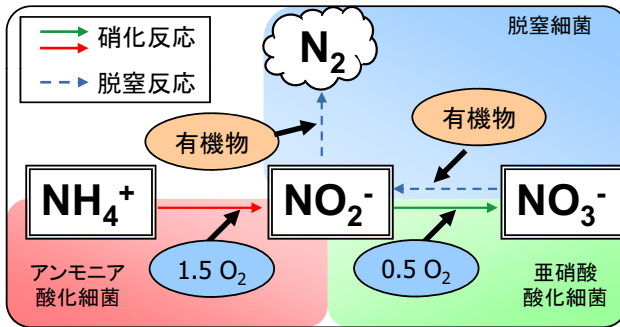
中間目標(基本計画の値)の達成度



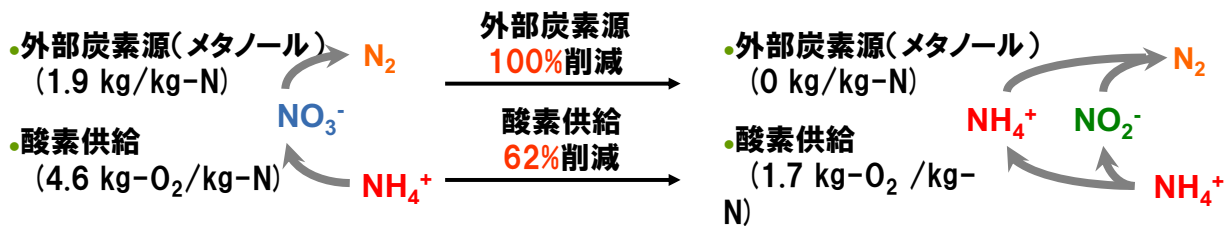
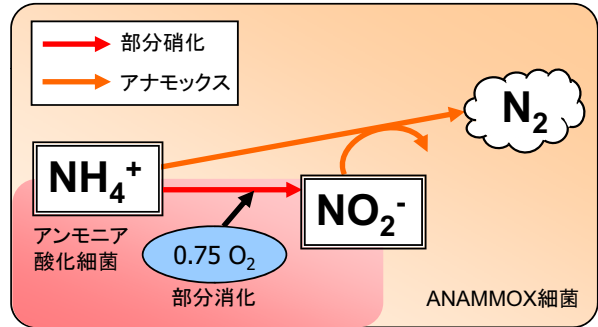
北海道大学(工学)

開発概要(従来の課題と本技術の新規性)

従来の硝化・脱窒反応による窒素除去



ANAMMOX反応による窒素除去



- ◆ ANAMMOX反応から温室効果ガス(N_2O ガス)は発生(部分硝化)
- ◆ 余剰汚泥の発生量も大幅(最大70%)に削減される。

超省エネルギー型の生物学的窒素除去プロセスとして期待

開発目標(最終目標)

嫌気性アンモニア酸化 (ANAerobic AMMonium OXidation: ANAMMOX) 法を軸とした高効率・省エネルギー、低コスト型窒素除去システムを開発する。

部分硝化—嫌気性アンモニア酸化(ANAMMOX)プロセスを提案

バイオデザイン化技術

アンモニア性窒素の亜硝酸までの部分硝化およびANAMMOX細菌の増殖促進を図るために微量のヒドロキシルアミン(NH_2OH)添加

バイオモニタリング化技術

各種分子生物学的手法および各種マイクロセンサーを用いてバイオフィーム内 *in situ* の微生物群集構造と機能を随時解析

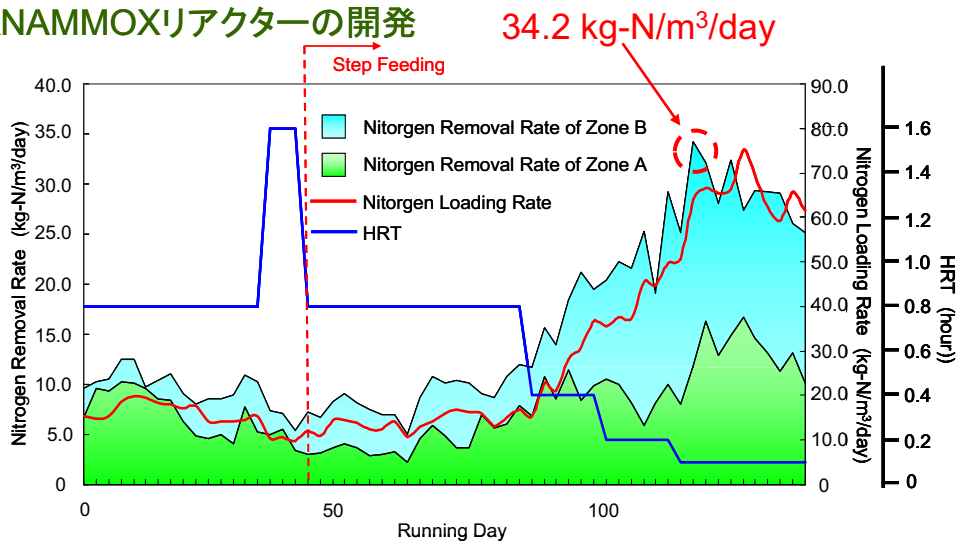
従来の硝化液循環型活性汚泥法と比較して、

- ◆ 10倍以上の窒素除去速度 (12Kg-TN/ m^3 /day)
- ◆ 50%以上のトータルランニングコストの削減

高効率・省エネルギー、低コスト型窒素除去システムの構築

研究開発の成果①

高効率ANAMMOXリアクターの開発



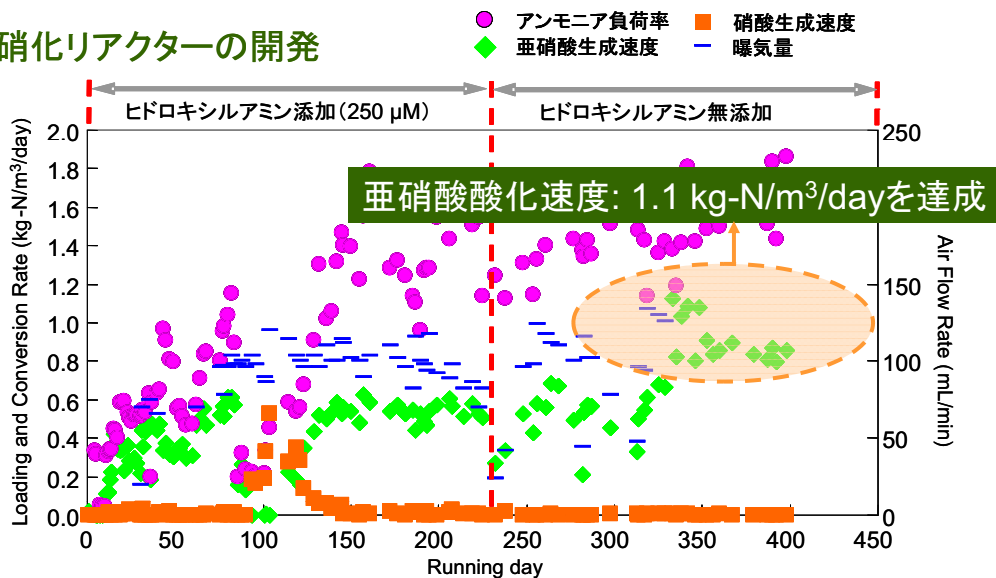
- ◆ 最大窒素除去速度 34.2 [kg-N m⁻³ day⁻¹]を達成 (世界最高)
- 既往の研究 Lab-scale (人工基質) : 9.8 kg-N/m³/day
- Pilot-scale reactor : 4-5 kg-N/m³/day
- ◆ 従来の硝化-脱窒法 都市下水 : 1-2 kg-N/m³/day

既存技術、先行技術に対して“約15倍”の効率化

39 / 75

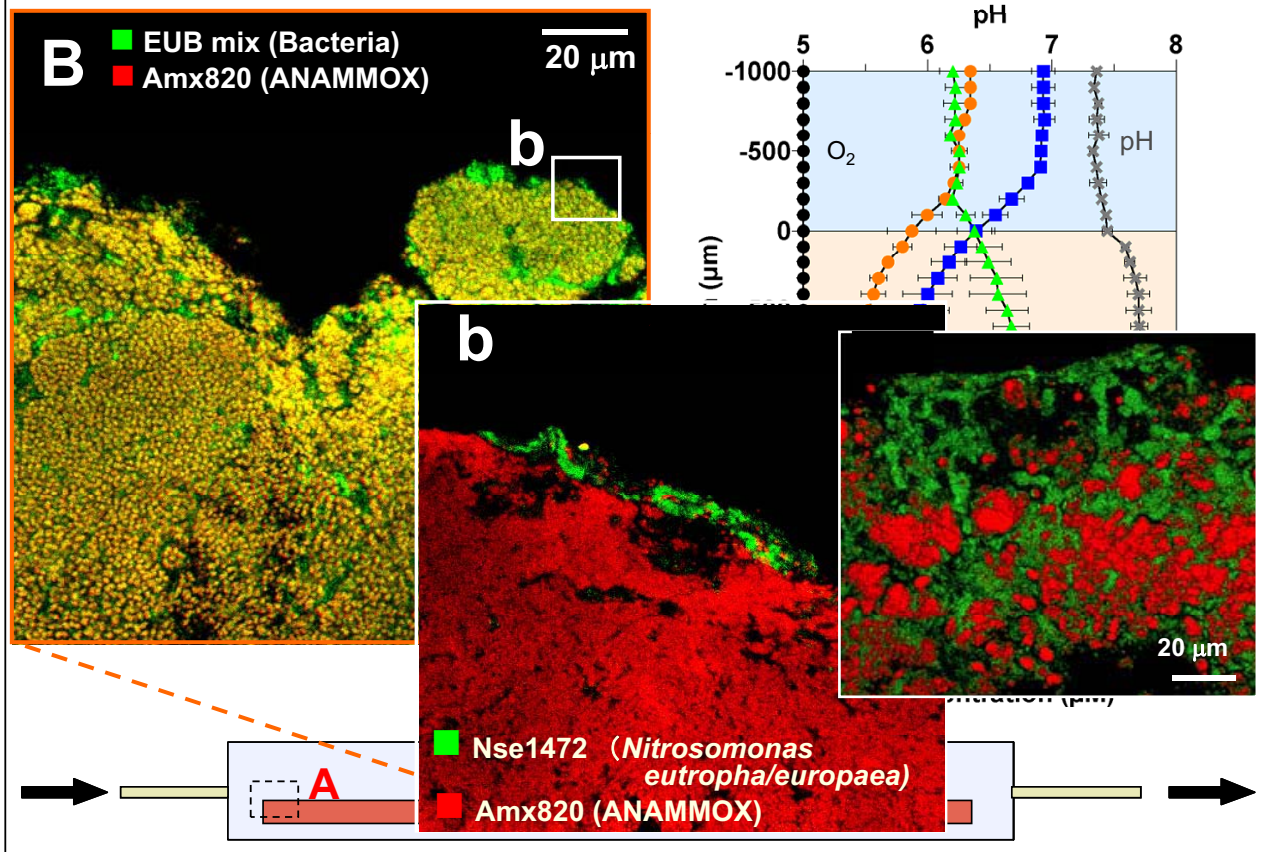
研究開発の成果②

部分硝化リアクターの開発



- 既存技術、先行技術に対して同等の効率だが、
- ◆ 酸素供給 (62%削減)、外部炭素源の供給 (100%削減)
 - ◆ N₂Oの生成が無い、余剰汚泥の削減等により、大幅なエネルギーおよびコストの削減を達成。 ➡ 高効率化

研究開発の成果③



中間目標の達成度、課題と対策

従来

循環型硝化脱窒素法

根拠となる数字

- 窒素除去速度: 1-2 kg-TN/m³/day
- 酸素ばっ気が必要: 1モルのNH₄⁺に対し2モルの酸素が必要
- 硝化液の循環のためにポンプが必要
- 脱窒反応のために外部炭素源が必要な場合がある。

中期目標

部分消化-Anammoxシステム

根拠となる数字

- 窒素除去速度: 34 kg-TN/m³/day (世界最高速度を達成)
- 酸素ばっ気が必要: 1モルのNH₄⁺に対し0.75モルの酸素が必要
- 硝化液の循環のためにポンプが不要
- 脱窒反応のために外部炭素源が不要
- 発生汚泥が大幅に削減可能(嫌気性かつ独立栄養性細菌なので)
- リアクター内のAnammox細菌のゲノム解析を完了

最低でも15倍の高速化・高効率化・省スペース化を達成

最終目標

高効率部分消化-Anammoxシステム

根拠となる数字

- スタートアップの効率化・安定化
- 部分消化反応の効率化を図り、全体の窒素除去速度の高速化
- Anammox細菌のゲノム情報を基に、Anammox細菌の活性化、亜硝酸および酸素耐性の強化、などを検討し、システム全体の高効率・安定化を達成する。

新規のAnammox細菌を発見
部分消化—Anammoxシステムを開発

ゲノム情報を基にAnammox細菌の能力向上
部分消化—Anammoxシステムの最適化

中間目標(基本計画の値)の達成度

研究項目	概要(中間目標の達成度)
①人工廃水を処理する部分硝化－ANAMMOX並列リアクターの開発	部分硝化－ANAMMOX並列型リアクターを作成した。この時のANAMMOXリアクターの最大窒素除去速度6.2 Kg-TN/m ³ /dを達成した。(達成率85%)
②部分硝化プロセスの最適条件の検討	②NH ₂ OH(濃度250 μM)を添加することで、迅速かつ安定的な部分消化反応を立ち上げることに成功した。(達成率85%)
③ANAMMOXプロセスの最適条件の検討	③二段ステップ流入式上向流バイオフィルムリアクターを構築した。最大窒素除去速度34.2 Kg-TN/m ³ /dを達成した。この値は、従来の硝化-脱窒法と比較して約30倍高い速度である。(達成率120%)
④分子生物学的手法およびマイクロセンサーによる微生物群集解析	④部分消化リアクターおよびANAMMOXリアクター内に存在する微生物群集構造を16S rRNA遺伝子解析およびFISH法により解析した。In Situ ANAMMOX活性を微小電極で測定した。(達成率100%)
⑤ANAMMOX細菌のメタゲノム解析	⑤我々のANAMMOXリアクターに存在するANAMMOX細菌のゲノムを決定するために、メタゲノム解析を行った。今後は、ゲノム情報を基に、ANAMMOXリアクターの効率化、安定化を図る予定である。(達成率100%)

43 / 75

北海道大学(地球環境)

44 / 75

開発概要(従来の課題と本技術の新規性)

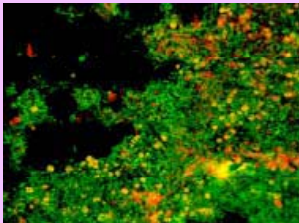
現状と課題



1. 好氣的活性汚泥処理法による窒素化合物除去に要する経費高



2. ボイラー原料油など原油は偏在する環境汚染物質・処理費用高のため放置され、ブラウンフィールド問題となっている



3. 細菌による原位置処理技術の経費高と二次汚染問題(細菌残留)

本技術の優位性・新規性

1. バイオフィーム工学による硝化槽の効率化・安定化
・新規活性汚泥細菌によるアンモニア酸化細菌(AOB)の活性増強
・AOBのバイオフィーム形成による安定化
・Anammox 菌グラニューール安定化

2. バイオフィーム工学を利用した原油分解細菌群の安定導入法の技術基盤開発

3. 植物との共生関係を利用した炭化水素分解細菌群のデザイン化と現場への導入法の開発
・植物根に形成した分解細菌群バイオフィームによる汚染物質の持続的分解
・浄化後、植物の除去と同時に導入細菌群を回収可能

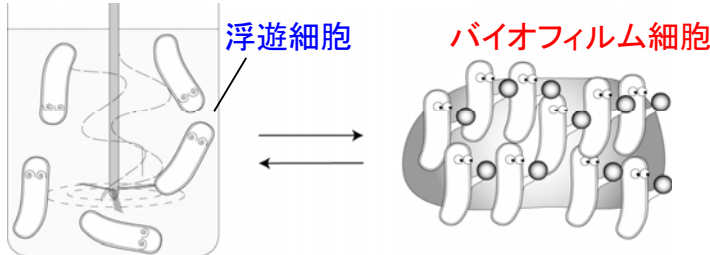


ウキクサ根圏

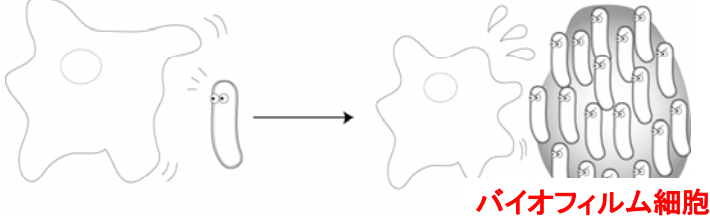
事業原簿 P.102

開発目標(最終目標)

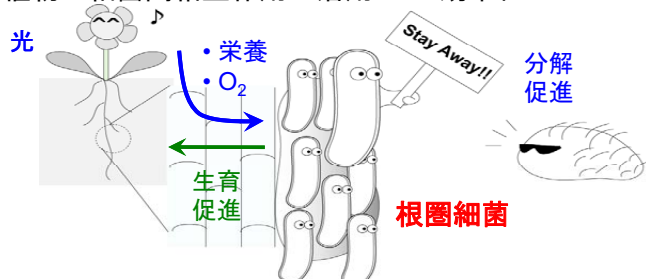
1. 微生物間相互作用の活用 → 効率化



2. 微生物定着性の向上 → 効率化



3. 植物-細菌間相互作用の活用 → 効率化



1-1. アンモニア除去速度:
30 mM NH₄/ 2days/
Nitrosomonas (OD₆₀₀=0.01)

1-2. Anammox 細菌グラニューール形成機構の理解と促進

1-3. *Nitrosomonas* および Anammox 技術を 3倍効率化

2. 原油分解速度を10倍効率化

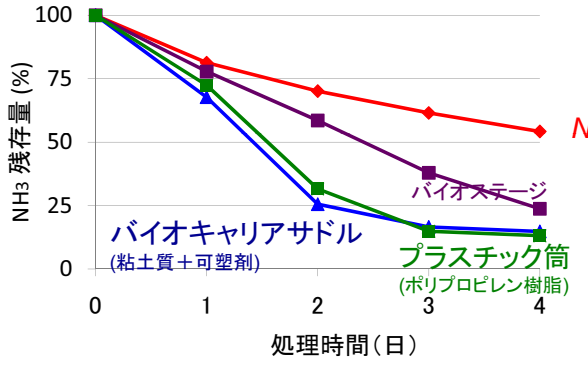
3. 水質汚染物質分解速度および持続期間を10倍効率化



従来比、コスト3分の1のアンモニアおよび炭化水素系廃棄物処理技術を完成

好気
嫌気

研究開発の成果①

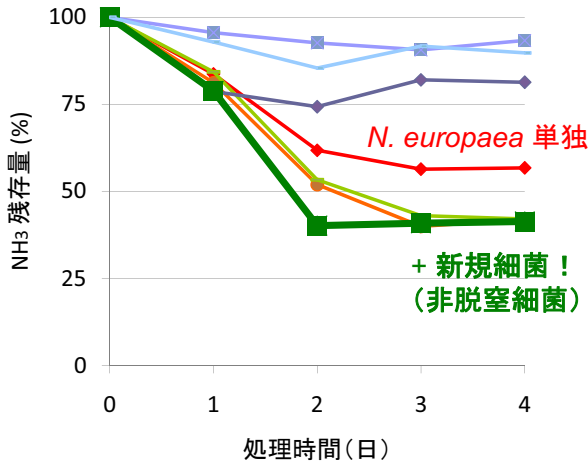


N. europaea 単独のバイオフィルム工学によりアンモニア除去の効率化約 3倍 (2日後に残存量 約3分の1)に成功!

N. europaea 浮遊
↓ 効率化
N. europaea 固定化 (バイオフィルム化?)



活性汚泥より発見した新規細菌との共培養によりアンモニア除去の効率化 (2日後に1.5倍の速度)を達成!

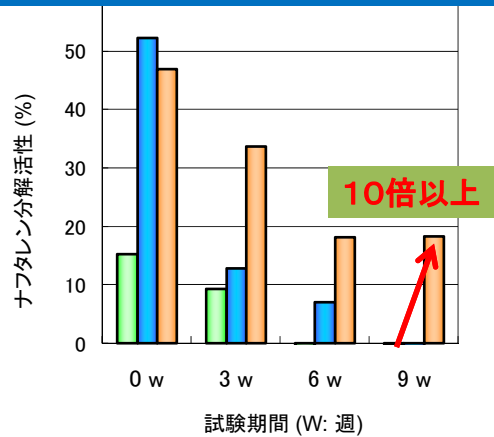


複合バイオフィルム工学による微生物群デザイン化技術の完成を目指す

好気

研究開発の成果②

石油汚染土壌への適用



days 0 2 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70

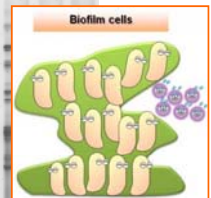
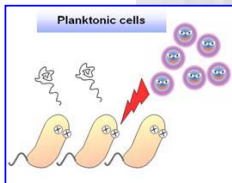
従来技術: 10週間後に分解細菌は死滅

0 2 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70

バイオフィルム工学: 10週間後分解細菌が生存



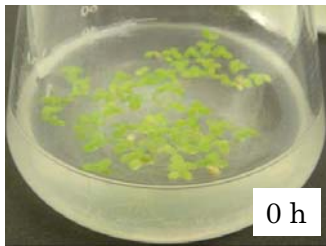
16SrRNA-PCR/DGGE 法による解析



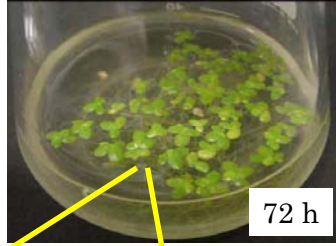
バイオフィルム工学により土壌浄化技術の効率化 (9週間後に10倍以上)に成功

好気

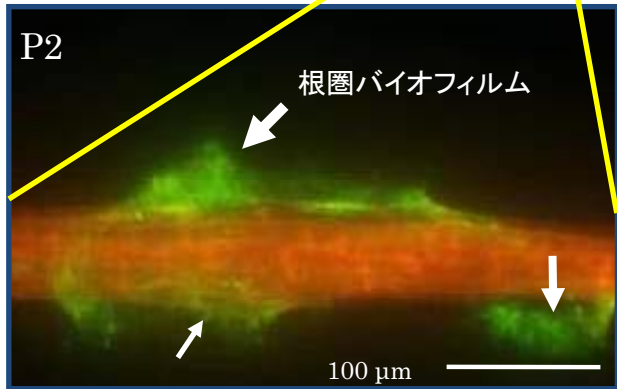
研究開発の成果③



0 h



72 h



P2

根圏バイオフィーム

100 μm

ca. 1×10^8 CFUs / root

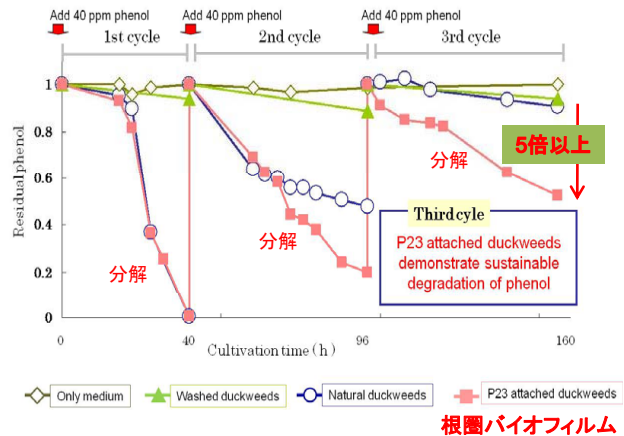
・栄養塩(リン、窒素)添加無用

・浄化後の細菌残留性を回避



二次汚染問題を同時に解決

さらに！根圏バイオフィームにより植物の生育が促進することを発見した



根圏バイオフィーム

根圏バイオフィームによる持続的水質浄化技術(160時間後に5倍以上効率化)

好気
嫌気

中間目標の達成度、課題と対策①

従来

中期目標

最終目標

(1) 好気アンモニア除去

対象実験値より、アンモニア除去速度(従来):

7.5 mM NH₄/ 2 days/
Nitrosomonas (OD₆₀₀=0.01)

担体表面でバイオフィーム化

新規ヘルパー細菌との共存

(1) 嫌気アンモニア除去

ブラックボックスとしてANAMMOX細菌を利用

ゲノム
タンパク
解析

(1-1) 好気アンモニア除去

実験値より、アンモニア除去速度(今回): **バイオフィーム化**

17 mM NH₄/ 2 days/
Nitrosomonas (OD₆₀₀=0.01)

Nitrosomonas細菌単独のバイオフィーム化により、アンモニア酸化活性が約3倍上昇することを初めて示した。

(1-2) アンモニア除去効率

実験値より、アンモニア除去速度(今回): **ヘルパー細菌共存**

15 mM NH₄/ 2 days/
Nitrosomonas (OD₆₀₀=0.01)

Nitrosomonas細菌の活性を約2倍促進する全く新しいヘルパー細菌を発見した！

(1) 嫌気アンモニア除去

ANAMMOX細菌グラニュール形成機構の部分理解

ゲノム
タンパク
解析

(1) 好気アンモニア除去

実験値より、アンモニア除去速度(最終目標):

30 mM NH₄/ 2 days/
Nitrosomonas (OD₆₀₀=0.01)

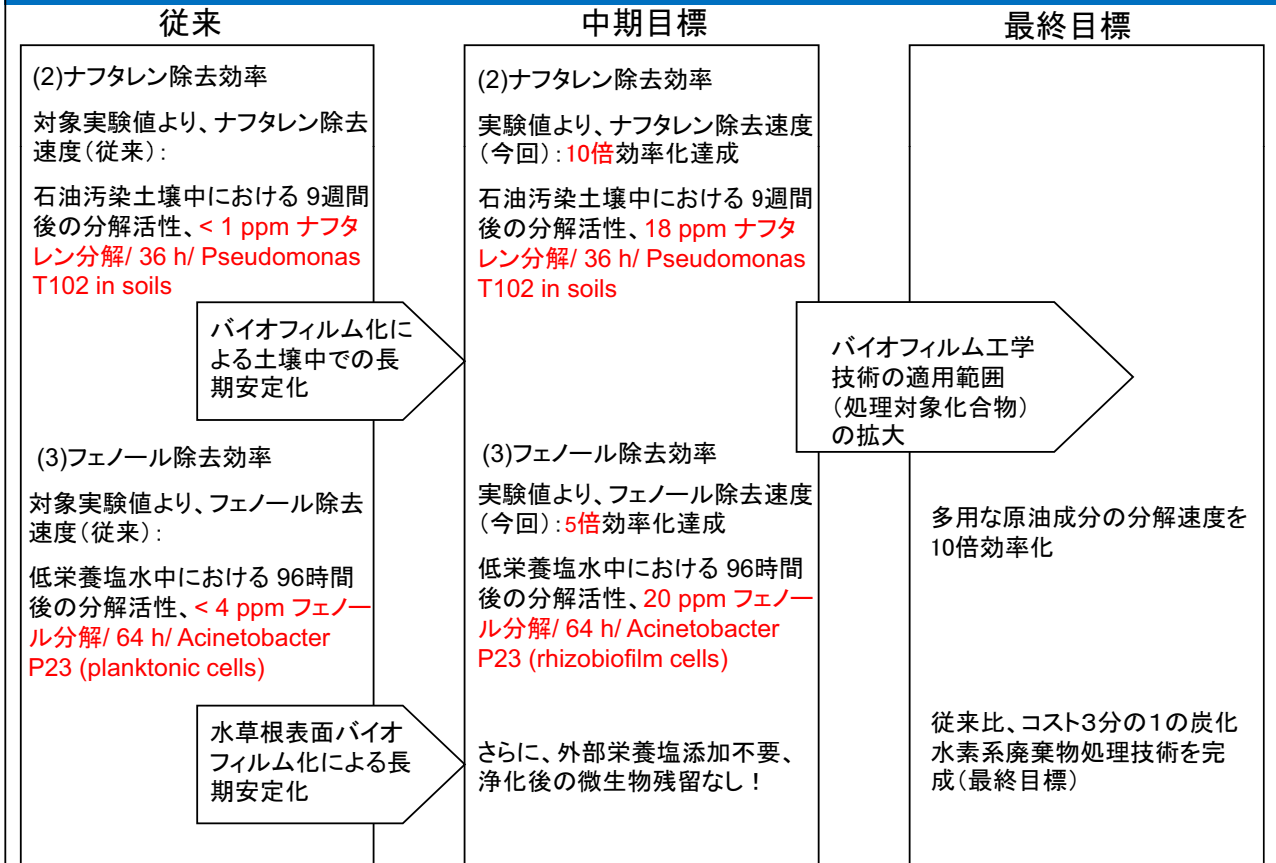
バイオフィーム化と新規ヘルパー細菌との共存作用の組み合わせ

従来比、3倍のアンモニア除去効率を達成(最終目標)

(1) 嫌気アンモニア除去

ANAMMOX細菌グラニュール形成機構の詳細理解
ANAMMOX技術を3倍効率化

中間目標の達成度、課題と対策②



早稲田大学

開発概要(従来の課題と本技術の新規性)

環境バイオ処理技術



どんな微生物? (メンバー・名前)
 どれくらい? (数・割合)
 どのように, どこに? (場所・空間特性)
 何をしている? (機能・活性)

多くのコンポーネントから構成される**複雑系**

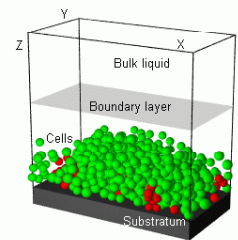
個々の現象を個別・詳細に解析しても系全体の理解に結びつけることは難しい

➡ 要素還元的な方法論(従来法)の限界

本技術のアプローチ 方法

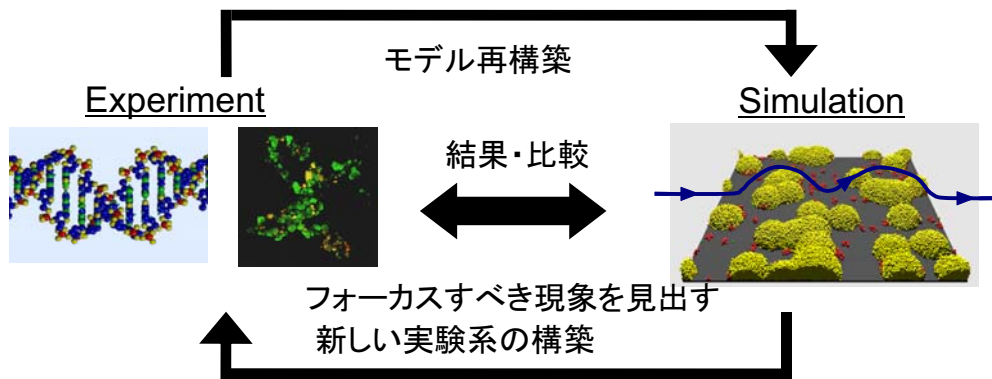


システム論的アプローチ
 シミュレーション支援に基づくシステムデザイン



事業原簿 P.109

開発目標(最終目標)



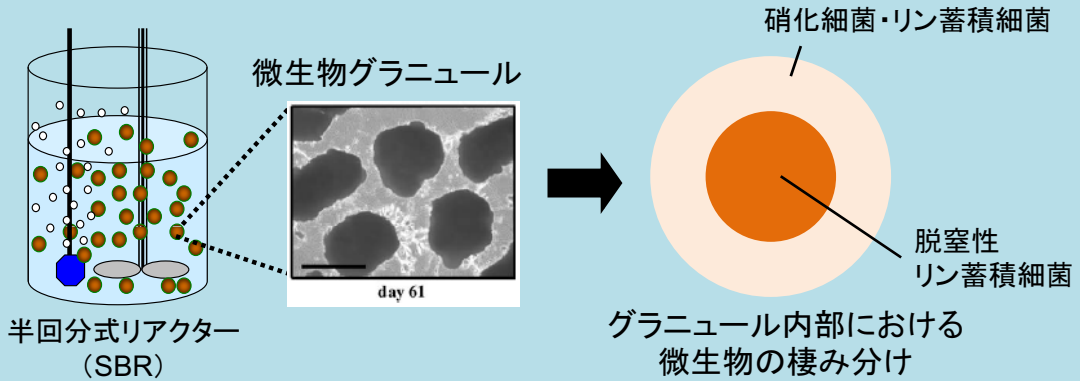
微生物コミュニティで起こる様々な現象の**因果関係・支配因子**の解析

微生物のデザイン化を
強力にサポートするシミュレーション技術の開発

研究開発の成果①

シミュレーションモデル(マクロモデル&マイクロモデル)の構築①

モデル対象：窒素・リン同時除去型リアクター



マルチスケールモデリング

マクロモデル

(リアクター内グラニューール個数・水質の予測)

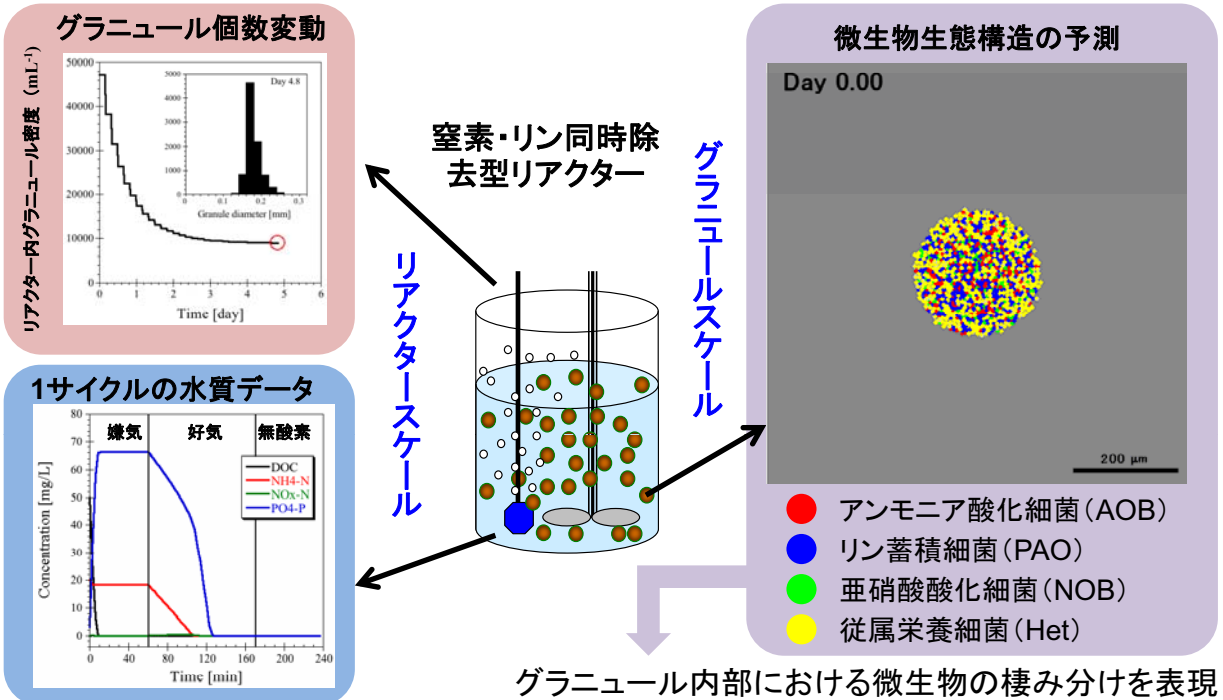
マイクロモデル

(微生物生態構造・水質の予測)

2つのスケールにおけるモデル化に成功

研究開発の成果②

シミュレーションモデル(マクロモデル&マイクロモデル)の構築②



グラニューール内部における微生物の棲み分けを表現

様々なスケールにおける実験データの予測が可能

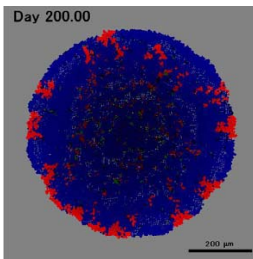
研究開発の成果③

取得実験データによるシミュレーションモデルの整合性評価

窒素・リン同時除去型
リアクターの運転

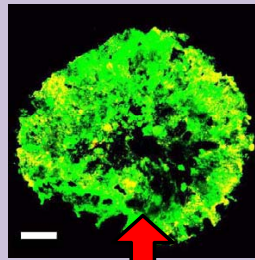


形成グラニューール



シミュレーション結果

FISH法による微生物コミュニティの**実験的**解明

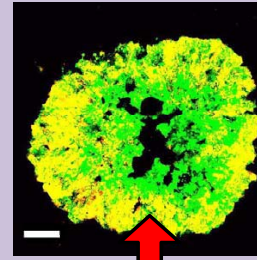


全細菌



アンモニア
酸化細菌

(アンモニア酸化細菌)
主に好気部位に点在



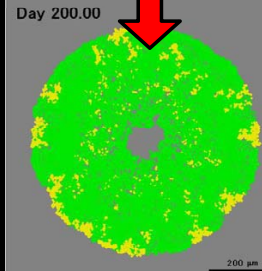
全細菌



リン蓄積
細菌

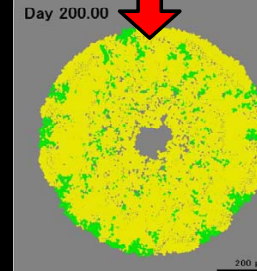
Bar, 200μm

(リン蓄積細菌)
グラニューール内で優占化



アンモニア
酸化細菌

その他の
生細菌



リン蓄積
細菌

その他の
生細菌

マイクロモデルによるシミュレーション結果

中間目標の達成度、課題と対策

従来

プロセス開発における
従来のアプローチ

試行錯誤 経験
実験の繰り返し

→ 非効率的

中間目標

シミュレーションモデル構築・
評価用実験データ取得

- ①微生物反応パラメータの
取得(目標達成)
- ②リアクター運転による水質
データ・グラニューール内部
の微生物生態構造データ
の取得(目標達成)

シミュレーションモデル構築

- ③スケールの異なる2種類
のモデルの新規構築、お
よび2つのモデルの結合
手法の確立(目標達成)

最終目標

システム論的アプローチに
基づく微生物コミュニティ
デザイン手法の確立

課題

(構築したシミュレーション
モデルが満たすべき条件)

- ・ 実験データとの整合性
- ・ 予測可能性

システム論的アプローチの適用
(シミュレーションモデルの構築)

適用先:
窒素・リン同時除去型リアクター

評価用実験データの蓄積

シミュレーションモデルの改良

- ・ 実験データとの整合性評価とモデル再構築
- ・ 実際的な応用を見据えたブラッシュアップ

③嫌気性処理

電力中央研究所

開発概要(従来の課題と本技術の新規性) ①

メタン発酵



生ごみなどの固形廃棄物

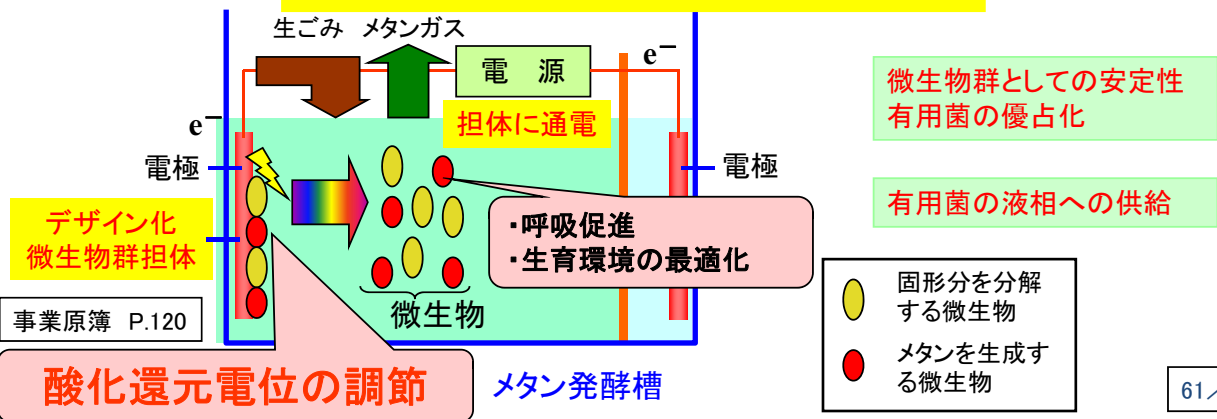
従来の課題

- ・固形廃棄物を対象とした場合、高負荷条件下での安定性に難
- ・微生物群内の主要微生物の特定や機能解明は行われているが、反応に関与する微生物群を制御する(デザイン化する)技術が無い

新規性

固定床(担体)メタン発酵の安定化を目指し、電気による微生物群のデザイン化技術を開発

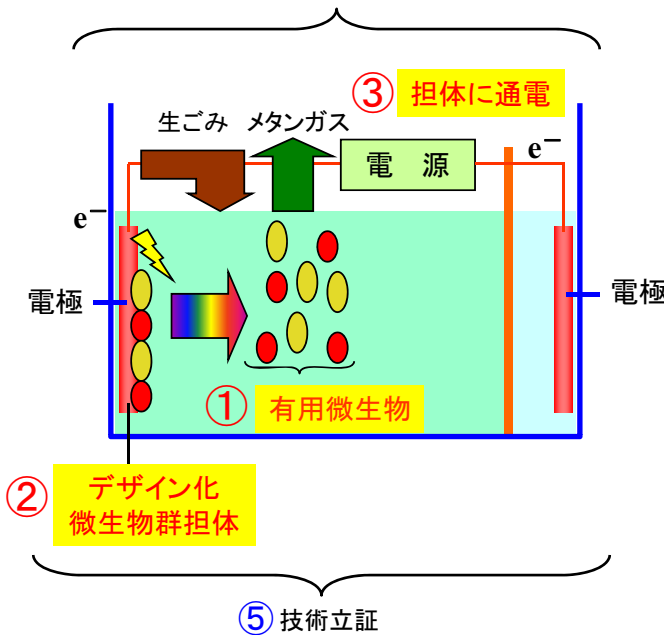
デザイン化微生物群担体の電気制御



開発目標(最終目標) ②

④ バイオエンジニアリング技術

①、②、③:H19-21 ④、⑤:H22-23



① 模擬廃棄物の分解に適した有用微生物群の取得と維持

② デザイン化微生物群担体の作成技術の開発

③ 電気によるデザイン化微生物群担体の制御技術の開発

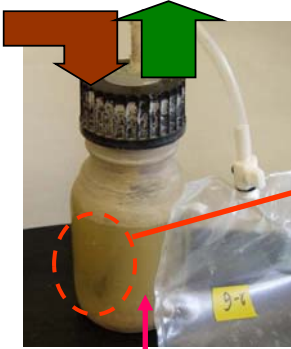
④ デザイン化微生物群担体のためのバイオエンジニアリング技術の開発

⑤ デザイン化微生物群担体を用いた固定床メタン発酵による技術立証

従来のメタン発酵槽容積に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率を向上

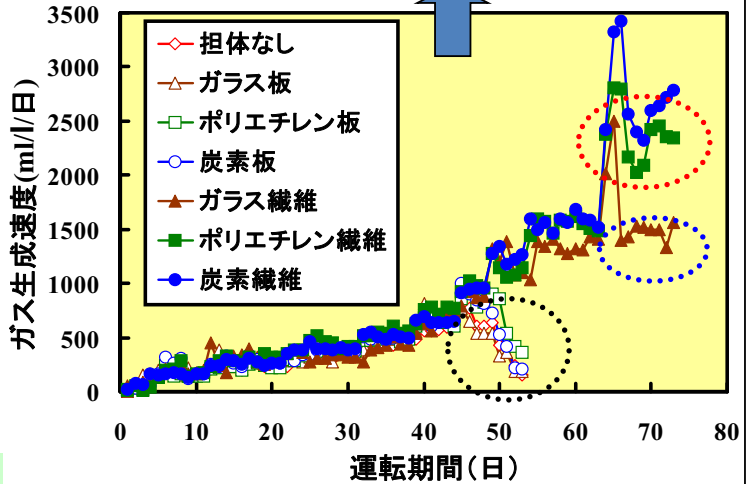
有用微生物群の取得とデザイン化微生物群担体の作成

模擬生ごみ メタンガス



高濃度の模擬生ごみを分解できる微生物群の取得に成功

用いる担体の性状によってメタンガス生成能力が異なる



性状の異なる担体を使用した検討により

担体の性状として、
3次元構造+高い空隙率

微生物量が増大

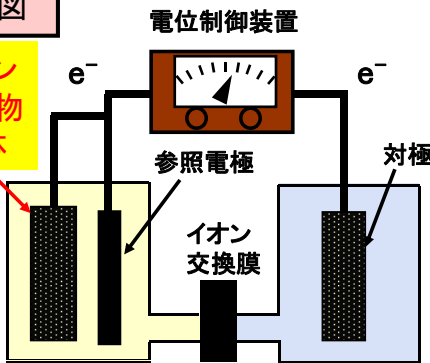
メタンガス生成能力の増大
有機物除去能力の増大

担体を選定し、デザイン化微生物群担体を作成

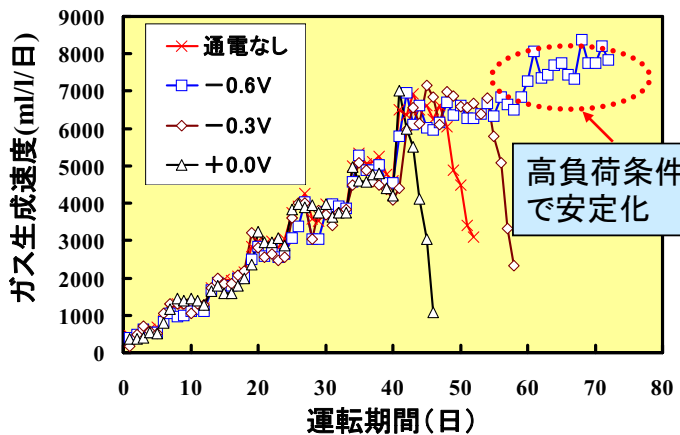
電気によるデザイン化微生物群担体の制御(発酵槽の性能)

実験装置の模式図

デザイン化微生物群担体 (作用極)



実験装置の写真



高負荷条件で安定化

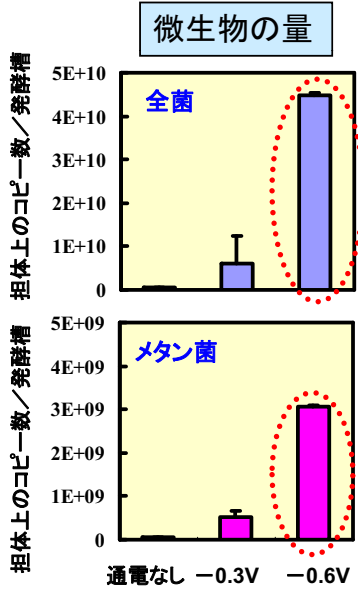
デザイン化微生物群担体 + 電気制御

通電による効果 (-0.6V)
・メタンガス生成能力の維持
・有機物除去能力の維持

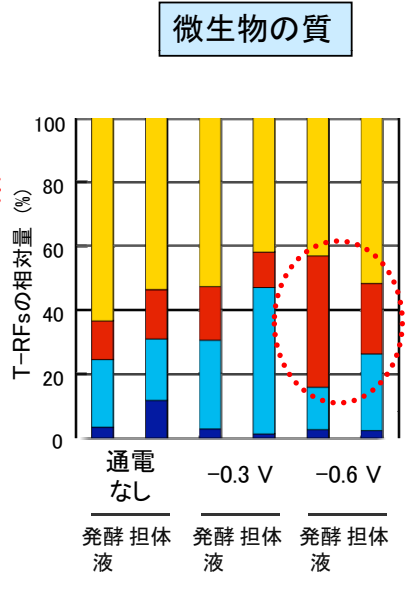
デザイン化微生物群担体の維持

高負荷条件での安定化に成功

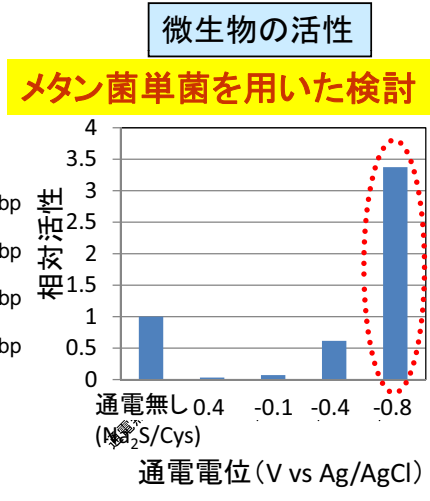
電気によるデザイン化微生物群担体の制御(微生物群集構造)



担体上で全菌、メタン菌量が増加



酢酸資化性メタン菌の割合が増大



メタン生成活性の増加

電気制御による効果を再確認

デザイン化微生物群の制御に成功

中間目標の達成度、課題と対策

従来

【現状の能力】

生ごみ等を対象として稼働している現行のメタン発酵処理施設

日平均容積効率:
8.5 kgCOD/m³/日

中間目標

【目標値】

従来の50%にコンパクト化

日平均容積効率:
17.0 kgCOD/m³/日

【達成度】

実験室規模での容量
250mlのメタン発酵槽

日平均容積効率:
18.8 kgCOD/m³/日

従来の45%にコンパクト化

最終目標

【目標値】

従来の50%にコンパクト化

日平均容積効率:
17.0 kgCOD/m³/日

【課題】

発酵槽のサイズを数L規模にスケールアップ



基本技術の立証

目標達成

【確立された新技術】

- ・有用微生物群の取得
- ・デザイン化微生物群担体の作成
- ・通電によるデザイン化微生物群の制御技術の確立

【対策】

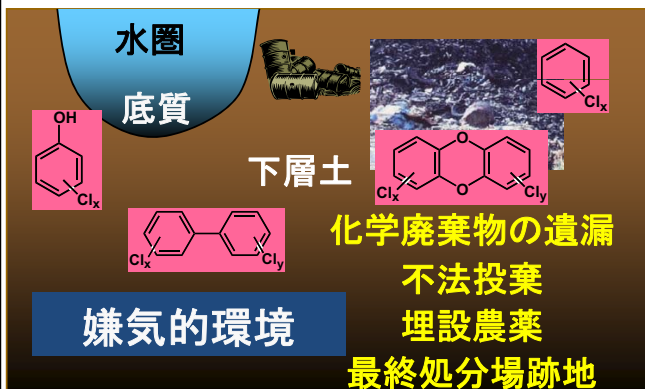
- ・バイオエンジニアリング技術
- ・スケールアップによる技術立証

名古屋大学

嫌気

開発概要(従来の課題と本技術の新規性)

嫌気性脱塩素・芳香族分解微生物のデザイン化による嫌気完全分解系の構築



- 嫌気環境に残留する芳香族塩素化合物
- 広範囲の物理化学的処理は非現実的

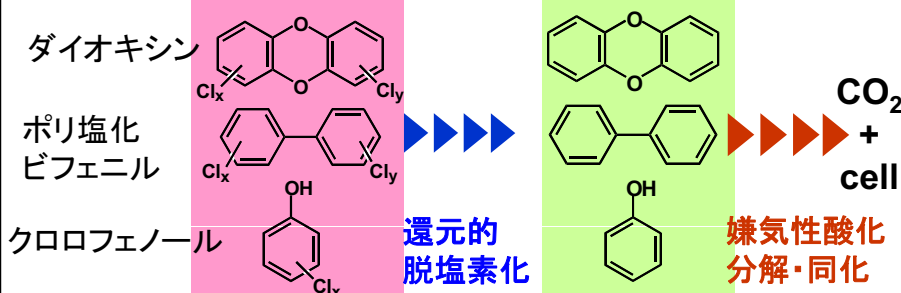
原位置生物分解技術が切望される

原位置生物分解技術における課題

- 浄化には、嫌気的脱塩素反応と好氣的芳香環分解反応の組合せが必要
- 嫌気・好気の切り替えは莫大なエネルギーと費用のため実行不可能

芳香族塩素化合物の新規な嫌気性完全分解方法

優位性

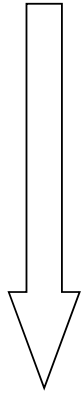


- 嫌気・好気切り替え不要
- 酸素供給系不要
- 容積効率高
- 安価
- 分解ステージ制御不要
- 不均一な原位置やドラム缶保管中の浄化実施可能

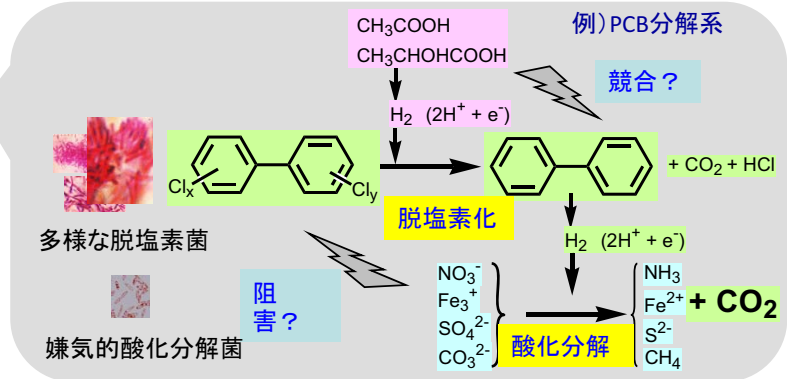
開発目標(最終目標)

開発項目

1. デザイン化に必要な有用嫌気性微生物群の取得
嫌気性脱塩素菌(群)、嫌気性酸化分解微生物(群)
2. 簡易な微生物安全性スクリーニング試験法の開発
3. 有用嫌気性微生物群のデザイン化に適した担体合成法の開発
4. 嫌気性脱塩素菌群と嫌気性酸化分解菌群のデザイン化による完全分解技術の開発
5. シミュレーションによる組合せ技術の適応性の評価



無機多孔性担体による異種微生物デザイン化



還元的脱塩素菌+嫌気性酸化分解菌の無機多孔性資材上へのデザイン化による芳香族塩素化合物の嫌気完全分解系の構築

最終目標

親水性芳香族塩素化合物の流れ場における高効率嫌気完全分解
疎水性難分解の芳香族塩素化合物の嫌気封じ込めによる完全分解の実現

研究開発の成果①

デザイン化に必要な嫌気微生物群の獲得に成功

芳香族塩素化合物	脱塩素菌	中間産物	嫌気的酸化菌	最終産物	完全分解系
ペンタクロロフェノール	<i>Firmicutes</i> を主とする微生物群	フェノール	硫酸還元微生物群 鉄還元微生物群	CO ₂ CH ₄	回分系成功 連続系成功
フサライド	<i>Firmicutes</i> を主とする微生物群 <i>Dehalobacter</i> sp.	4-Cl-phthalide	集積中	—	連続系で脱Cl成功
PCB	<i>Firmicutes</i> を主とする微生物群 <i>Dehalobacter</i> sp.	biphenyl, monoCB _s	集積中	—	—



新規脱塩素菌 *Dehalobacter* sp. の単離に成功

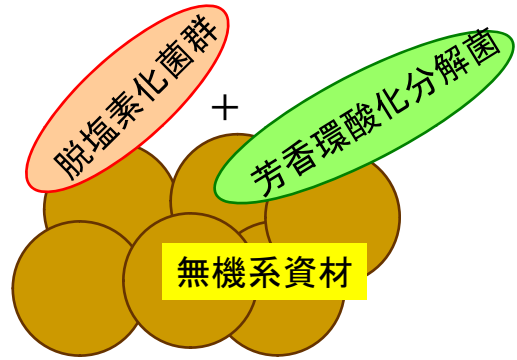
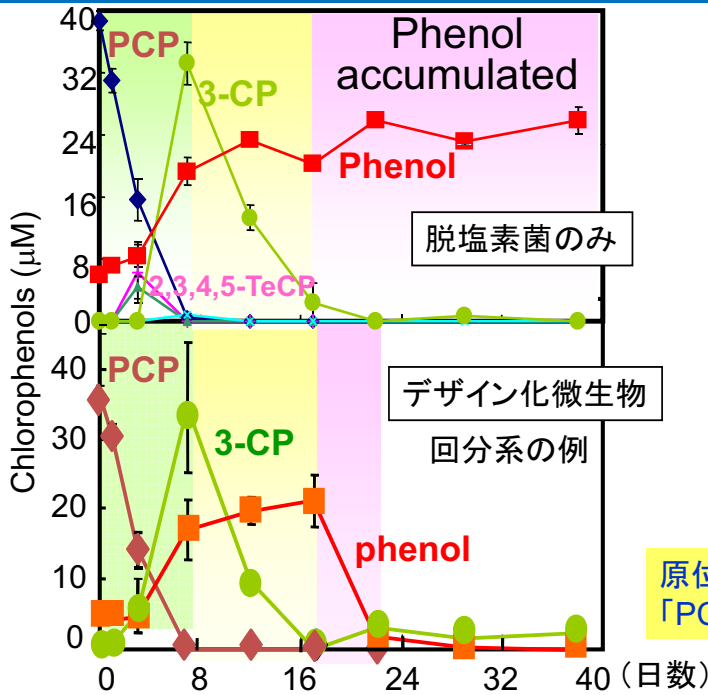
広く環境中に分布する安全な微生物

一方で、



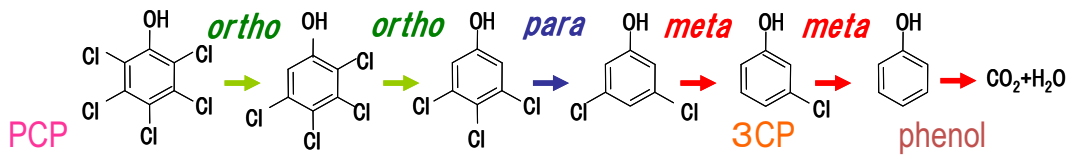
微生物群に対する病原性有無の簡易判定法を考案

研究開発の成果②

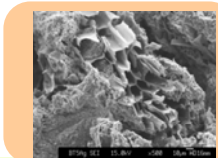


ペンタクロロフェノール (PCP)嫌気完全分解のデザイン化に成功

原位置の透過性反応浄化壁設計に必要な「PCP(50μM)を30日以内の分解」を達成



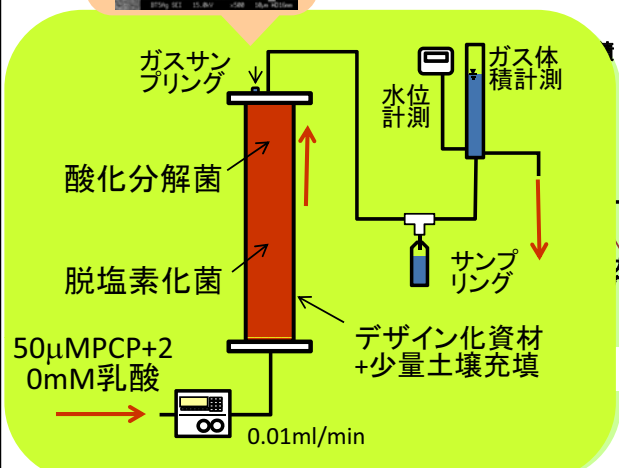
研究開発の成果③



● 最適資材開発

材料選択と製造プロセスによる

嫌気微生物に適した資材特性解明と合成法に目処



● 連続浄化試験

クロロフェノール完全分解を、2カラムから1カラムシステムへ微生物デザイン化によりコンパクト化成功

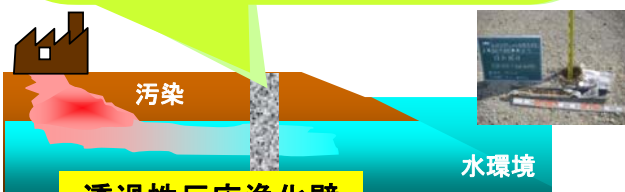
→ 透過性反応壁として適用を可能に

● 予測モデルの開発

微生物バイオマスに基づく分解活性予測モデルの開発

室内実験と現場パラメータから、環境浄化速度を予測する方法論を開発

→ 現地における微生物分解速度および浄化期間の高精度予測が可能に



透過性反応浄化壁

中間目標の達成度、課題と対策

従来技術	中間目標	最終目標
<p>有害な多塩素化芳香族塩素化合物の微生物完全分解には、嫌氣的脱塩素反応と好氣的酸化分解反応が必要</p> <p>嫌気と好気の分解ステージ制御が必要(実際には不可能)</p> <p>根拠資料 Furukawa: Biosci Biotech Biochem, 70: 2335-48 (2006) Ehlers&Rose: Water Environ. Res. 78:701-708 (2006)</p>	<ol style="list-style-type: none"> ① 嫌気性脱塩素菌(群)と嫌気性酸化分解微生物(群)の取得(ほぼ目標達成)クロロフェノール類 ② 簡易な病原菌検出法の開発(目標達成)病原菌の特異的性質に注目 ③ 有用嫌気性微生物群のデザイン化に適した担体の性質解明(ほぼ目標達成)合成担体での確認試験中 ④ 嫌気性脱塩素菌群と嫌気性酸化分解菌群のデザイン化による完全分解技術の開発(ほぼ目標達成) 原位置浄化に必要な50μMクロロフェノールの回分系での分解(<30日)を世界に先駆け達成、流れ場でも分解成功。 ⑤ 回分系シミュレーションモデル構築(ほぼ目標達成)微生物バイオマスに基づく活性推定モデル 	<ol style="list-style-type: none"> ① 嫌気性脱塩素菌(群)と嫌気性酸化分解微生物(群)の取得ポリ塩化ビフェニル・ダイオキシン類 ② 簡易な新規微生物安全性スクリーニング試験法の開発 実施例の蓄積 ③ 有用嫌気性微生物群のデザイン化に適した担体合成法の開発最適化合成法の確立 ④ 嫌気性脱塩素菌群と嫌気性酸化分解菌群のデザイン化による完全分解技術の開発 流れ場に加えて、疎水性芳香族化合物の嫌気封じ込め完全分解系の構築 ⑤ 流れ場シミュレーションモデルによる組合せ技術の適応性の評価 原位置流れ場シミュレーションモデル
<p>新規Dehalobacter属菌の発見 嫌気性脱塩素菌と嫌気性酸化分解菌の嫌気デザイン化により、 世界に先駆けペンタクロロフェノール完全分解に成功</p>		<ul style="list-style-type: none"> ・ 流れ場でのクロロフェノール類(50μM)完全分解(30日未満)能力の長期維持 ・ ポリ塩化ビフェニル・ダイオキシン類等の嫌気封じ込め 完全分解系の構築

中間目標(基本計画の値)の達成度

1. 比較的親水性の芳香族塩素化合物を対象に、嫌気性脱塩素菌と嫌気性芳香族酸化分解菌を選抜し、無機担体上へのデザイン化による嫌気性での芳香族塩素化合物完全分解を可能にする。(100%達成)
実用化可能な嫌気+嫌気微生物技術の開発に成功した。
2. デザイン化微生物群の活性を高める条件を明らかにし、透過性反応壁として必要な活性(50μMのペンタクロロフェノールを30日以内に完全分解)を、従来技術の50%コンパクト化をした反応場で達成する。(90%達成)
 回分系では既に達成(50μMを24日で完全分解)
 従来のコンセプトである嫌気+好気微生物技術(非実用化技術)と同容積反応場(2カラムシステム)で同等の速度(16日程度)で完全分解を達成
 嫌気+嫌気微生物技術の50%コンパクト化反応場(1カラムシステム)で、26日で85%完全分解を達成。更に活性向上を行う。

省エネルギーおよび低コスト化の試算

想定場面: PCP表層土汚染～地下水汚染の浄化処理
 (広さ1,000m³、地下水面GL-3m、不透水層GL-7m)

従来技術: 遮水・掘削除去・熱脱着 47,780千円、453t-CO₂

本技術: 嫌気+嫌気微生物デザイン化技術 **31,360千円、168t-CO₂**

PJ成果のまとめ

好気性処理

- 活性汚泥法
内生呼吸低減率
40%達成(目標35%)
- 高効率油脂分解
従来のグリーストラップ
と比べ3倍の効率化
- 石油分解
*Cycloclasticus*の培養
支持体の部分構造と
機能を解明

好気嫌気処理

- 部分硝化-ANAMMOX
世界最高の窒素除去速度
達成
システムの省スペース化
- バイオフィルム工学
アンモニア除去の効率
約3倍
- 溶存メタン酸化分解
人工排水中の溶存メタン
90%以上除去
- シミュレーションモデル構築
パラメータの取得
2つのモデルの構築・結合

嫌気性処理

- 高効率メタン発酵
従来の45%のコンパクト化
- 芳香族塩素化合物の
一貫嫌気分解
従来の嫌気+好気技術
に比べ約1/2のコンパクト化

2年後に最終目標を達成できる見込み