

「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」
事後評価報告書

平成24年10月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

平成24年10月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
理事長 古川 一夫 殿

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会 委員長 西村 吉雄

NEDO技術委員・技術委員会等規程第33条の規定に基づき、別添のとおり
評価結果について報告します。

目次

| | |
|-----------------------------|----------|
| はじめに | 1 |
| 分科会委員名簿 | 2 |
| 審議経過 | 3 |
| 評価概要 | 4 |
| 研究評価委員会におけるコメント | 7 |
| 研究評価委員会委員名簿 | 8 |
| | |
| 第1章 評価 | |
| 1. プロジェクト全体に関する評価結果 | 1-1 |
| 1. 1 総論 | |
| 1. 2 各論 | |
| 2. 個別テーマに関する評価結果 | 1-15 |
| 2. 1 好気性処理 | |
| 2. 2 嫌気性処理 | |
| 3. 評点結果 | 1-25 |
| | |
| 第2章 評価対象プロジェクト | |
| 1. 事業原簿 | 2-1 |
| 2. 分科会における説明資料 | 2-2 |
| | |
| 参考資料1 評価の実施方法 | 参考資料 1-1 |
| 参考資料2 評価に係る被評価者意見 | 参考資料 2-1 |
| 参考資料3 分科会議事録 | 参考資料 3-1 |
| 参考資料4 評価結果を受けた今後の取り組み方針について | 参考資料 4-1 |

はじめに

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構においては、被評価プロジェクトごとに当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定している。

本書は、「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」の事後評価報告書であり、第31回研究評価委員会において設置された「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」（事後評価）研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第32回研究評価委員会（平成24年10月10日）に諮り、確定されたものである。

平成24年10月
独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」

事後評価分科会委員名簿

(平成24年4月現在)

| | 氏名 | 所属、役職 |
|------------|--------------------|-----------------------------------|
| 分科会長 | えんどう ぎんろう 遠藤 銀朗 | 東北学院大学 工学部 環境建設工学科 教授 |
| 分科会長 代理 | ふるかわ けんじ 古川 憲治 | 熊本大学 顧問 (名誉教授) |
| 委員 | はらだ ひでき 原田 秀樹 | 東北大学 大学院工学研究科 土木工学専攻 教授 |
| | みたに ゆたか 三谷 優 | サッポロビール株式会社 価値創造フロンティア研究所 研究主幹 |
| | むらかみ たかお 村上 孝雄 | 地方共同法人 日本下水道事業団 理事 |
| | やすい ひでなり 安井 英斉 | 北九州市立大学 国際環境工学部 エネルギー循環化学科 教授 |

敬称略、五十音順

審議経過

第1回 分科会（平成24年4月19日）

公開セッション

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
2. 分科会の公開について
3. 評価の実施方法と評価報告書の構成について
4. プロジェクトの概要説明
5. プロジェクトの詳細説明
6. 全体を通しての質疑
7. まとめ・講評
8. 今後の予定
9. 閉会

第32回研究評価委員会（平成24年10月10日）

評価概要

1. 総論

1) 総合評価

微生物群のデザイン化による高効率処理技術の開発という全体目標に対して、廃水・廃棄物処理微生物生態系の人工的構築・人工的制御という観点から有望な成果が多く得られている。これまで複合微生物系を使うバイオ処理において、処理を担う微生物群集についてはブラックボックスとして取り扱われ、制御がなされてきた。これに対して、バイオ処理の中心を担う微生物を特定し、その微生物が十分に能力を発揮できるよう、微生物の機能的特性を理解したうえで最適な空間配置を考えるというコンセプトのもと、意欲的な目標を掲げ研究開発に取り組んだ点は評価できる。

しかし、開発された諸技術は、実用化という視点からは、個別の研究課題における達成度に差異が見られる。一部のテーマでは基礎的段階の研究で終わっているものがある。今後、実用化に近い技術は早期の実用化を計り、基礎的とはいえ革新的な技術に繋がる可能性のある新規な知見が得られているものについては、それらの知見を生かした技術の実用化に結実することを期待したい。

2) 今後に対する提言

生物学的廃水・廃棄物処理の新技術の研究と開発に本プロジェクトの成果がどのように利用できるかを明示することが必要と考えられる。また、得られた成果をさらに多くのタイプの廃水および廃棄物の処理に適用するには、どのような検討課題が残されているかについて明らかにすることが必要と考える。そのためには、実用化の段階にあるテーマについて、実施者は開発した技術の適用先を決定し、実プラント規模での実証試験の実施を検討して欲しい。

また、実用化イメージにおいて、一気通貫型システムが提案されているが、本プロジェクトで開発した技術の実用化においては、この形だけにこだわらず、各構成技術の個別の実用についても、ニーズがあれば積極的に推進して行くべきである。

今後、有望な新規技術が開発されたことを実施者は広く PR して、積極的な情報提供を図って欲しい。

2. 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

廃水・廃棄物処理の微生物群の人為的制御という基盤技術の開発は、基礎的

研究の色彩が濃く、民間企業のみで推進するよりも大学他の研究機関と緊密な共同研究体制で推進すべきであり、NEDOの関与は妥当である。

バイオ技術を活用して、エネルギー消費効率を改善する新規な環境浄化技術の開発は、内外のニーズが高く、国際競争力の強化や省エネルギーに特に資すると考える。今後、発展途上国にも適用可能な、我が国独自のバイオ処理技術が確立されることを期待したい。

一方、「微生物群のデザイン化」は生物処理技術全般に活用可能な目標概念と言えるが、その適用領域が本プロジェクトの目的や課題設定から明確には見えてこない点は改善が必要であったと考える。

2) 研究開発マネジメントについて

研究開発目標は十分に戦略性を有し、非常に高い意欲的な目標を設定していることは評価できる。また、プロジェクトリーダーには全体を統括するための適任者が選任されており、プロジェクトリーダーの指導の下、適切かつ円滑な運営がなされた。

しかし、研究成果の実用化の方向性は十分に理解できるものの、実用化に繋げるために今後なされる必要のある課題の整理については、必ずしも十分ではないように見えた。また、研究開発過程で明らかになったことを踏まえ、限られた予算と時間であったがゆえに、中間評価以降はさらに重点テーマを絞ってもよかったのではないかと考える。さらに、実用化を見据えるために商用設備ベンダー企業をもっと増やしてもよかった。

3) 研究開発成果について

本プロジェクトの開始に当たって設定された数値目標を含む目標値に対して、個別テーマごとにやや差があるが、得られた研究の成果はそれらをほぼ達成していると評価できる。また、いくつかのテーマでは、新たな技術領域を開拓しており、世界に誇れる研究成果を挙げていることから、これらの成果を実用化に結び付けて欲しい。

一方で、日本オリジナル技術を創成しているにもかかわらず、必ずしも知的財産権等の取扱が適切に行われているとは言えないものもあり、それらについては早急な知的財産権の登録作業を推進すべきである。

また、研究開発成果についての情報発信は重要であり、実施者は今後、成果の対外的公開と普及をどのように推進するかについて検討を行うべきである。

4) 実用化の見通しについて

個々のテーマにおいては、いくつかの独創的で有意義な研究成果があがって

おり、今後さらに微生物群のデザイン化による高効率型バイオ処理技術の開発が進捗すると考えられる。

また、それぞれの個別テーマを連結させた一貫通貫型システムが提案されており、実用化イメージ・出口イメージが示されていることは一定の評価をすることができる。

但し、いくつかのテーマにおいて、研究としての出口イメージおよび実用化イメージが明確にはなっていないものがある。また、要素技術の開発がグループごとに個別で行われていて、成果を実用化につなげるための全体としての体制がやや不十分であった。特に、嫌気微生物処理については、研究がベンチスケール規模の試験プラントのみで行われていることから、実用化のイメージをつかむことができない。スケールアップした処理装置での研究開発に早急に取り組んで欲しい。

研究評価委員会におけるコメント

第32回研究評価委員会（平成24年10月10日開催）に諮り、本評価報告書は確定された。研究評価委員会からのコメントは特になし。

研究評価委員会

委員名簿（敬称略、五十音順）

| 職 位 | 氏 名 | 所属、役職 |
|-----------|-------|--|
| 委員長 | 西村 吉雄 | 技術ジャーナリスト |
| 委員長 代理 | 吉原 一紘 | オミクロンナノテクノロジージャパン株式会社 最高顧問 |
| 委員 | 安宅 龍明 | 元一般社団法人ナノテクノロジービジネス推進協議会 企画運営推進会議 副議長 |
| | 伊東 弘一 | 学校法人早稲田大学 理工学術院 総合研究所 客員教授（専任） |
| | 稲葉 陽二 | 学校法人日本大学 法学部 教授 |
| | 尾形 仁士 | 三菱電機株式会社 社友 |
| | 小林 直人 | 学校法人早稲田大学 研究戦略センター 教授 |
| | 佐久間一郎 | 国立大学法人東京大学 大学院工学系研究科 附属医 療福祉工学開発評価研究センター センター長／教授 |
| | 佐藤 了平 | 国立大学法人大阪大学 大学院工学研究科 マテリア ル生産科学専攻（システムデザイン領域担当） 教授 |
| | 菅野 純夫 | 国立大学法人東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授 |
| | 宮島 篤 | 国立大学法人東京大学 分子細胞生物学研究所 教授 |
| | 吉川 典彦 | 国立大学法人名古屋大学 大学院工学研究科 マイクロ・ナノシステム工学専攻 教授 |

第1章 評価

この章では、分科会の総意である評価結果を枠内に掲載している。なお、枠の下の「○」「●」「・」が付された箇条書きは、評価委員のコメントを原文のまま、参考として掲載したものである。

1. プロジェクト全体に関する評価結果

1. 1 総論

1) 総合評価

微生物群のデザイン化による高効率処理技術の開発という全体目標に対して、廃水・廃棄物処理微生物生態系の人工的構築・人工的制御という観点から有望な成果が多く得られている。これまで複合微生物系を使うバイオ処理において、処理を担う微生物群集についてはブラックボックスとして取り扱われ、制御がなされてきた。これに対して、バイオ処理の中心を担う微生物を特定し、その微生物が十分に能力を発揮できるよう、微生物の機能的特性を理解したうえで最適な空間配置を考えるというコンセプトのもと、意欲的な目標を掲げ研究開発に取り組んだ点は評価できる。

しかし、開発された諸技術は、実用化という視点からは、個別の研究課題における達成度に差異が見られる。一部のテーマでは基礎的段階の研究で終わっているものがある。今後、実用化に近い技術は早期の実用化を計り、基礎的とはいえ革新的な技術に繋がる可能性のある新規な知見が得られているものについては、それらの知見を生かした技術の実用化に結実することを期待したい。

〈肯定的意見〉

- これまで複合微生物系を使うバイオ処理において、処理を担う微生物群集についてはブラックボックスとして取り扱われ、ドンブリ勘定的な制御がなされてきた。これを、処理の中心を担う微生物を特定し、その微生物が十分に機能を発揮できるよう、微生物の生理特性を理解したうえで最適な棲みか（空間配置）を考えるというコンセプトのもと、意欲的な目標を掲げ研究開発に取り組んだ点は大いに評価できる。
- 微生物群のデザイン化による高効率処理技術の開発という全体目標に対して、廃水・廃棄物処理微生物生態系の人工的構築・人工的制御という観点から多くの研究成果を収めた研究プロジェクトであると評価することができる。なお、本研究プロジェクトの研究成果の多くは、本研究で取り組んだ排水処理微生物生態系の解析技術の開発によるものであり、そのような解析技術開発の成果をも含んでいると評価できる。
- 下排水処理の省エネルギー化、高速化には、関与微生物を意図したように制御する技術が求められることから、「微生物のデザイン化」という本事業の開発概念は適切である。
- 本事業の実施により、微生物を利用する新規な排水処理・廃棄物処理技術の開発が行われ、有望な成果が多く得られている。このことから、本事業の目的は達成されているものと考えられる。
- 個別テーマそれぞれで具体的な成果が得られていることは特筆できる。
- 廃水・廃棄物処理はそもそも混合微生物系の利用技術であるから、その微生物群集を効率的に利用していく上で、微生物構成、生物群の空間的配置およ

び微生物コミュニティの人為的制御に向けた基盤技術のベースとなるものを確立するというのが、本事業の目的である。したがって、開発項目の要素技術の開発によってある程度達成されたと判断できる。個別課題のなかには、せっかく世界的レベルに達する優れた内容の成果を得たものもあるが、概して5年間というプロジェクト期間のなかで **publication** や特許申請という果実にまでたどり着けていないものも多々見受けられる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 事後評価の方法論として、好気グループ、嫌気グループの範疇で評価することを求められているが、各グループ内でも優れた成果を達成したサブジェクトと、そうでない（やや不満足な）サブジェクトもあり、グループ内ではばらついていて、グループ全体としては肯定的な評価にすべきか辛い評価にすべきか迷いがちである。したがって、好気グループ、嫌気グループでの一括評価方式ではなくて個々の研究課題ごとの個別評価方式にすべきであろう。
- 本研究によって得られた根幹となる微生物群のデザイン化の成果について、さらに整理してより理解しやすい形に取りまとめていただければ、本研究によって得られた成果が今後の生物学的排水処理技術の開発においてさらに広く活用されるようになると考えられる。全体的に、事業原簿における研究成果が個別の研究の成果としての記述に留まっているものがあって研究事業の統合化された成果がやや見えにくい点は、改善される必要があると考えられる。
- 最終目標の記述と個別テーマの成果にやや乖離がある。事業目的を達成するために個別テーマが活発に活動していることが本来のあるべき姿なので、「最終目標」の記述内容について中途で見直しを徹底すべきであったと考える。また、減点主義ではない視点で、ブレークスルーやその可能性が得られた研究、別の方向で発展が期待できる研究、うまくいかないと判断した研究等に結果を分類すべきである。そうしないと、数値目標を計算上で満たす変な説明に陥ってしまう。このようになると、研究投資として最も効率が悪くなるし、NEDO・PL・実施者にとってもことなかれ主義に陥ってしまう懸念がある。
- 事業選定と実施には国民に対する説明責任が生じるが、近年、特に「グローバル展開を目指す産業の育成を強力に推進するため」とか「下排水処理に纏わる国内外の喫緊の課題を至急で解決するため」などのような我が国を取り巻く環境変化があるので、目標達成するための国の諸々の施策と本事業との立ち位置・分担を再度明示すれば、更に分かりよいと思う。そのうえで、国民がまず知るべきことは、どのような環境負荷をどのような方法(省エネ重視であればそのように)で、どのレベルまで下げるべきかだと思ふ。従来比による相対的目標(好気：3倍の効率化、嫌気：50%コンパクト化)より、国民生活から生み出される環境負荷(絶対値)は本技術開発でどれほ

どコストダウンできるのかとか、開発成果はグローバル市場におけるシェア獲得にどの程度貢献できるとかを知りたいと感じる。

- 開発された諸技術は、実用化という視点からは、達成度にかかなりの差異が見られる。実用化に近い技術は早期の実用化を計り、そうでない技術については、今後、技術的熟度を高めてゆくことが重要である。
- NEDO の補助事業であることから、実用化が視野に入る研究成果が求められる。この観点から個々の研究テーマを精査すると、一部のテーマで基礎的に研究に終わっているものがある。しかし、基礎的とはいえ革新的な技術に繋がる可能性のある新規な知見が得られていることから、この知見を生かした実用化研究に進展することを今後期待したい。

2) 今後に対する提言

生物学的廃水・廃棄物処理の新技术の研究と開発に本プロジェクトの成果がどのように利用できるかを明示することが必要と考えられる。また、得られた成果をさらに多くのタイプの廃水および廃棄物の処理に適用するには、どのような検討課題が残されているかについて明らかにすることが必要と考える。そのためには、実用化の段階にあるテーマについて、実施者は開発した技術の適用先を決定し、実プラント規模での実証試験の実施を検討して欲しい。

また、実用化イメージにおいて、一気通貫型システムが提案されているが、本プロジェクトで開発した技術の実用化においては、この形だけにこだわらず、各構成技術の個別の実用についても、ニーズがあれば積極的に推進して行くべきである。

今後、有望な新規技術が開発されたことを実施者は広く PR して、積極的な情報提供を図って欲しい。

〈今後に対する提言〉

- ・ 想定される実用化イメージにおいては、「一気通貫型システム」が提案されている。事業成果の実用化においては、このような形で進めるのが理想的であろうが、この形だけにこだわらず、各構成技術の個別の実用的適用についても、ニーズがあれば積極的に推進して行くべきである。
- ・ 処理微生物群の人為的制御に資するための基礎研究(基盤研究)であるから、あまりに強く出口(数値目標を設定して)を意識する必要はないのではないだろうか。
プロセスの効率化の究極的なゴールとして、省エネルギー化率 50%という性急な目標を掲げるのは、却って基盤技術の開発にとって弊害になることが危惧される。
- ・ 「環境負荷低減効果に対する投入費用」＝「リーズナブル」という示し方によって、本事業を通じて国民を啓蒙すれば、成果の普及振興に役立つと思う。また、NEDO による成果公表は、WEB site での成果公開や冊子出版による事業内容紹介が行なわれているが、マスコミを招請してプレス会見する回数を増やしてはどうだろうか。投入費用対効果の説明や、国内外技術レベルとの対比を多くの人々に知らしめて幅広い支持を得ることができるようになると思う。
- ・ 実用化の段階にあるテーマは、開発した技術の適用先を早急に見つけ、実プラント規模での実証試験を行って欲しい。
実用化には遠いテーマについては、研究を継続し、実用化にこぎ着ける努力を求めたい。
- ・ チャレンジングな事業目的を設定する限り、期中で大胆に目標(項目・数値)を見直してもよい。そうしないと、事業自体を予定調和的に終えようとする引力が発生してしまい、硬直化した運用に陥る可能性がある。

目標を見直すことに躊躇してはいけない。企業的な視点に立てば、目標は事業目的を達成するための戦術にしか過ぎず、これを墨守する必要は全く無い。目標の変更は、本来の事業目的を達成するための別ルートを見つけたことと見なし、加点としてもよい。事業目的の理念をベースに、PLの技術的判断で目標を柔軟に変更できる運用を強化する必要があると考える。

- ・ 生物学的廃水・廃棄物処理の新技术の研究と開発に、本研究事業の成果がどのように利用できるかを明示することが必要と考えられる。また、本研究で得られた成果を、さらに多くのタイプの廃水および廃棄物の処理に適用するには、どのような検討課題が残されているかについても明らかにすることが必要と考えられる。

〈その他の意見〉

- ・ 有望な新規技術が開発されたことを広くPRして、積極的な情報提供を図って頂きたい。
- ・ 開発の方向性がニーズオリエンテッド的に妥当かを知るために、事業主体であるNEDO(推進部署等)あるいは選任された検討会議などが事業実施内容に対するユーザーウォンツの吸い上げ(直接的なヒアリングなど)を適宜実施したらどうか。
- ・ アナモックス法、DHS法、PHA分解細菌バイオフィーム法などについて、下水処理や土壌浄化技術としての標準化と技術・装置規準化、および廃水・廃棄物処理微生物生態系解析法の標準化を関係規制省庁等に働きかけるとともに、これら規制省庁と共に国際標準化に向けて国際的な働きかけを強化することが必要と考えられる。
- ・ 中間評価での研究項目の絞り込み・選別化によって、限られた予算を特定の研究課題に後半の研究期間で集中させて加速することによってメリハリをつけた研究開発マネジメントは高く評価できる。その結果、いくつかの研究課題では独創的で世界水準から見ても卓越した研究成果が上がっている。これらの研究成果の積極的な特許等の知財化を推進すべきである。

1. 2 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

廃水・廃棄物処理の微生物群の人為的制御という基盤技術の開発は、基礎的研究の色彩が濃く、民間企業のみで推進するよりも大学他の研究機関と緊密な共同研究体制で推進すべきであり、NEDO の関与は妥当である。

バイオ技術を活用して、エネルギー消費効率を改善する新規な環境浄化技術の開発は、内外のニーズが高く、国際競争力の強化や省エネルギーに特に資すると考える。今後、発展途上国にも適用可能な、我が国独自のバイオ処理技術が確立されることを期待したい。

一方、「微生物群のデザイン化」は生物処理技術全般に活用可能な目標概念と言えるが、その適用領域が本プロジェクトの目的や課題設定から明確には見えてこない点は改善が必要であったと考える。

〈肯定的意見〉

- 開発対象とした技術は、内外のニーズが高い。これは国際競争力の強化や省エネルギーに特に資すると考える。
- 本研究事業は、廃水・廃棄物処理における関与微生物群のデザイン化により新規な高効率の環境バイオ技術を開発することを目的としたものであり、NEDO 事業として「環境安心イノベーション」を促進するという目的の達成に寄与していると評価することができる。
- 廃水・廃棄物処理の微生物群の人為的制御という基盤技術の開発は、必然的に基礎的研究の色彩が濃く、民間企業のみで推進するよりも大学・研究機関と緊密な共同研究体制で推進すべきであり、NEDO が関与する（国が援助する）ことは妥当であると考えられる。また、本事業のなかで展開された研究課題には、単に効率化の数値を上げることを目標とするものばかりに限らず、将来の新たな技術革新につながる先端的な研究課題も多く含まれており、我が国のこの分野での国際競争力を養う意味では大変有意義な事業であったと判断できる。
- バイオ技術を活用して、エネルギー消費効率を改善する新規な環境浄化技術を開発するという事業の位置づけは的を射ている。公共事業の縮減、海外への生産拠点の移転が進む昨今の我が国の情勢から、わが国のバイオ処理に関係する業界は委縮気味であり、NEDO の関与で発展途上国にも適用可能な、我が国独自のバイオ処理技術が確立されることを期待したい。
- NEDO 事業として妥当であり、その事業目的も妥当である。
- (1)NEDO の事業としての妥当性
選定された課題は公共性が極めて高いことから、国の機関による事業取りまとめは妥当と考える。また、開発内容履行のために投じられた予算は常識的なレベルと考える。
- (2)事業目的の妥当性

「廃棄物や環境負荷物質の環境バイオ処理」は日本のお家芸であり、得意分野の伸長は国際的な競争力維持に重要なので妥当と考える。

〈問題点・改善すべき点〉

- 下排水処理関連の事業としては NEDO 以外にも我が国の他の機関が実施しているので、「環境安心イノベーション」「エネルギーイノベーション」が NEDO の分担として適切であること、即ち、他の機関でなく NEDO バイテク・医療技術部が担当すべき課題であることを明示するのがわかり良いと考える。
- 実用化の面では、経済的フィージビリティではまだ距離が大きいものがみうけられた。各個別研究課題間での一層の連携が望まれる。
- 「微生物群のデザイン化」は生物処理技術全般に活用可能な基本目標・目的と言えるが、その応用範囲および適用領域が本研究の目的や課題設定から明確には見えてこない点は改善が必要ではなかろうか。
- 「環境安心イノベーションプログラム」、「エネルギーイノベーションプログラム」傘下の他のプロジェクトとはどの程度、連携したのか？
- 開発技術が窒素除去と温暖化ガスを削減する処理技術に最終的に偏ってしまった。本来の開発テーマからすると、もっと幅広い分野で研究開発が行われるべきであった。

〈その他の意見〉

- ・ 具体的技術開発の事業目的は、個々の研究課題のなかで示されており妥当であるが、得られた汎用的知見に関する研究成果が水処理技術の開発体系の中でどのように位置づけられ、今後の多くの水処理分野における技術開発に活かされることになるかといった、研究成果の将来的意義および価値についてやや評価しにくい点が残る。

2) 研究開発マネジメントについて

研究開発目標は十分に戦略性を有し、非常に高い意欲的な目標を設定していることは評価できる。また、プロジェクトリーダーには全体を統括するための適任者が選任されており、プロジェクトリーダーの指導の下、適切かつ円滑な運営がなされた。

しかし、研究成果の実用化の方向性は十分に理解できるものの、実用化に繋げるために今後なされる必要のある課題の整理については、必ずしも十分ではないように見えた。また、研究開発過程で明らかになったことを踏まえ、限られた予算と時間であったがゆえに、中間評価以降はさらに重点テーマを絞ってもよかったのではないかと考える。さらに、実用化を見据えるために商用設備ベンダー企業をもっと増やしてもよかった。

〈肯定的意見〉

○ (1)研究開発目標の妥当性

嫌氣的窒素処理は新規技術として国内外で開発競争が激化している分野であり重点化は妥当と考える。

(2)研究開発計画の妥当性

テーマを「発散フェーズから集中フェーズへと収斂していく手順」は順当であると感じた。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

プロジェクトリーダーの指導の下に円滑な運営がされていたと感じた。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

参加メンバー中の商用設備ベンダーにスケールアップを依頼するなどの連携がされており、一定の成果につながったと思う。

(5) 情勢変化への対応等

時間を要する開発課題であるために(具体的には、微生物を用いる処理は反応速度が遅いことや、季節要因を調べるために通年試験が必要なこと)、比較的緩慢な変化対応で支障なかったと思う。

○ 目標・事業体制等は妥当であり、実施者間でも適切な連携が行われたと思われる。

○ 藤田プロジェクトリーダーのもと適切な研究開発マネジメントが行われている。最終目標に関しては、非常に高い意欲的な目標が設定されており評価できる。加速予算でパイロットプラントを建造した研究テーマについては、実用化の見通しがついたものと評価できる。これらの研究テーマについては、早急に実プラントの受注に結び付け、実プラントの運転を通じて目標が達成できているかどうかを検証することが求められる。

○ 廃水・廃棄物の生物学的処理技術の分野では、我が国オリジナル技術が不足しており、国際的競争力の弱さが多々指摘されているので、NEDO が関与する（国が財政支援する）本事業は大変有意義であり、かつ時宜を得ている

と思われる。

- 総合的に判断して、本プロジェクトの研究開発マネジメントは妥当であったと考えられる。
- 研究開発目標の設定は十分に戦略性を有しており、今後の技術開発への波及効果も十分に期待できると評価できる。また、開発目標を定量的に設定した点も評価できる。さらに、研究開発計画は個々の研究課題については具体的で緻密に立てられており、その個々の研究課題の進行を実施するに適切な研究開発チームが構成されている。プロジェクトリーダーには全体を統括するための適任者が選任されており、実施期間途中における計画見直しも適切に実施されている。

〈問題点・改善すべき点〉

- 平成 21 年度までに研究開発が終了したテーマについては、その後、どのような展開があったのかという点についての情報がなかった。
- NEDO の補助事業であることを念頭に、基礎的な研究で終わっているものについては、得られた成果をさらに掘り下げ、バイオ処理技術の効率化、省エネ化に結び付けられるようにしなければならない。
- 研究成果の実用化の方向性は十分に理解できるが、実用化に繋げるために今後なされる必要のある研究開発課題の整理が必ずしも十分ではないように見られる。知財マネジメントの方針等においてこの点を明確にしつつ、研究成果の実用化戦略の再構築を取りまとめることが必要であると考えられる。
- 総論で記したとおり、社会経済の情勢変化という外部要因のみならず、研究開発過程で明らかになったことを踏まえ、内部要因による計画の見直しも徹底するとよい。
- (1)研究開発目標の妥当性
開発目標を相対的尺度で数値化されているが、「環境安心」「エネルギー」寄与の社会的コストから見たレベル感が伝わりにくかったように思う。
- (2)研究開発計画の妥当性
前半から(中間評価まで)テーマ数を絞って(具体的には、中間報告以降の後半の実実施数程度)スタートし、中間評価以降はさらに重点テーマを絞ってもよかったのではないか。事業開始時に選抜された個々のテーマにはそれぞれ解決すべき課題が含まれていたと思うが、喫緊課題やグローバルな競争関係に照らして、必ずしも「3 倍の効率化、50%のコンパクト化」を達成し、「どうしても実用化につなげねばならない目標」でない(そのような意気込みを感じられない)テーマが一部に見受けられた。限られたコストと時間(事業リソース)なので、最も鍵となる開発要素を選抜して集中するのがよいのではないか。
- (3)研究開発実施の事業体制の妥当性

実用化を見据えるために商用設備ベンダーの参加数(割合)をもっと増やしてもよかったように思う。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性
知財マネジメント戦略の説明を増やしてはどうか。

〈その他の意見〉

- 本事業は、微生物のデザイン化（微生物群の人為的制御方法に資するための基盤技術の開発）に係わる先端的な要素技術の研究課題に係わるものである。したがって、効果が短期的に出てくるものとは限らないため、費用便益比率のみで本事業の妥当性を評価することは必ずしも適切ではない。
- 研究計画は、一貫した見直し方針の下に適切に修正されており、この点での研究マネジメントは十分になされたと評価できる。

3) 研究開発成果について

本プロジェクトの開始に当たって設定された数値目標を含む目標値に対して、個別テーマごとにやや差があるが、得られた研究の成果はそれらをほぼ達成していると評価できる。また、いくつかのテーマでは、新たな技術領域を開拓しており、世界に誇れる研究成果を挙げていることから、これらの成果を実用化に結び付けて欲しい。

一方で、日本オリジナル技術を創成しているにもかかわらず、必ずしも知的財産権等の取扱いが適切に行われているとは言えないものもあり、それらについては早急な知的財産権の登録作業を推進すべきである。

また、研究開発成果についての情報発信は重要であり、実施者は今後、成果の対外的公開と普及をどのように推進するかについて検討を行うべきである。

〈肯定的意見〉

- 研究成果については、多くの論文、口頭発表がなされており評価できる。この研究プロジェクトで得られた成果の多くは世界最高水準のものであり、これらの成果を実用化に結び付けることを希望したい。
- (1)目標の達成度
個々の設定課題としては、目標達成されたと思う。
- (2)成果の意義
成果は国際的に見劣りすることはなく新知見を含み、予算相応だと感じられた。
- (4)成果の普及
教育研究機関が採択されたことから多くの学術報告がされたと思う。
- 研究開発成果は全体として目標を達成しており、また、意義のある成果が得られたものと考えられる。
- 本研究の開始に当たって設定された数値目標を含む目標値に対して、得られた研究の成果はそれらをほぼ達成していると評価できる。研究の成果は、個別研究課題ごとにやや差があると思われるが、中には新たな技術領域の開拓に特に貢献すると評価されるものが見うけられる。また、個別の研究成果によっては汎用性および波及効果の高いものがあると評価できる。
- いくつかの研究課題（とくに好気性処理の広島大学と北海道大学（地球環境））、および嫌気性処理の北海道大学（工学）では、果敢に“新たな技術領域”を開拓しており、世界に誇れる研究成果を挙げている。せっかくの日本オリジナル技術を創成しているにもかかわらず、必ずしも知的財産権等の取扱いが適切に行われているとは言えないので、早急な知的財産権の登録作業を推進すべきである。

〈問題点・改善すべき点〉

● (1)目標の達成度

「従来比で 3 倍効率化、50%コンパクト化」という目標設定(表現方法について)は基準点が曖昧で、如何様にも説明できると思う。

(2)成果の意義

国としての戦略テーマ(他国に対して突出した技術レベル)を絞り込んで、比較優位を築いていただくというやり方もあったのではないか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

グローバルマーケットに堅い地歩を築くためにも知財戦略を重視したテーマ選抜、事業運営は欠かせない。

(4)成果の普及

一般に向けて発せられた情報を、マスコミ報道などを通じて見聞することがなかった。情報発信を検討中ならば是非とも実施されるよう希望する。各研究機関から各学研究会にて研究報告される際に、各学研究会に働きかけて、マスコミ向けに情報発信機会を増やすのも効果的と思う(日本生物工学会などで実施している事例あり)。

● 今後、研究開発成果についての情報発信が重要。

● 知的財産権の取得成果については必ずしも十分とは言えない。また、個々の研究成果の論文としての対外的発表については、研究課題によって差が見られる。今後は、本研究の成果の対外的公開と普及をどのように推進するかについて検討を行っていただきたい。

● 全体として、期初に定めた目標について数値をあわせて追認しているような印象を受ける。「数値目標達成」という官僚的な判断ではなく、技術的な確信を持って「市場の拡大・市場の創造につながる」というようにして欲しい。

● 必ずしも海外ジャーナルへの **publication** が十分とは言えない状況なので、活発に成果発信すべきである。

● 好気性微生物処理に関しては当初の目標を十分に達成しているとは評価できない。評価の対象を窒素除去に絞った時にのみ達成可能な目標となっている。嫌気性微生物処理については、目標を達成できる基礎的知見が十分に得られているとは判断できないので、今後更なる研究の継続を求めたい。

4) 実用化の見通しについて

個々のテーマにおいては、いくつかの独創的で有意義な研究成果があがっており、今後さらに微生物群のデザイン化による高効率型バイオ処理技術の開発が進捗すると考えられる。

また、それぞれの個別テーマを連結させた一貫型システムが提案されており、実用化イメージ・出口イメージが示されていることは一定の評価をすることができる。

但し、いくつかのテーマにおいて、研究としての出口イメージおよび実用化イメージが明確にはなっていないものがある。また、要素技術の開発がグループごとに個別で行われていて、成果を実用化につなげるための全体としての体制がやや不十分であった。特に、嫌気微生物処理については、研究がベンチスケール規模の試験プラントのみで行われていることから、実用化のイメージをつかむことができない。スケールアップした処理装置での研究開発に早急に取り組んで欲しい。

〈肯定的意見〉

- それぞれの個別テーマを連結させたシステムスキームを提示したことは評価できる。しかしながら、それ以外にも多様な開発技術・知見の深化方向があるはずなので、個別テーマそれぞれの特性を発展させた実用化イメージまたは学問開拓のイメージが示されるとなおよかった。
- 個々の研究課題における成果については既に実用化に至っているものがあり、今後さらに微生物群のデザイン化による高効率型バイオ処理技術の開発が進捗すると考えられる。このことから、環境関連バイオ技術分野への波及効果は期待することができる。
- 研究開発成果に基づいた「一貫型システム」が提案されており、実用化イメージ・出口イメージが示されている。新規な微生物技術であり、関連分野への波及効果が期待できる。
- 好気微生物処理については、得られた研究開発の成果から実用化のイメージをつかむことができる。早く実プラントの受注に結び付け、このプロジェクトで求められている市場の拡大につなげて欲しい。
- いくつかの独創的で有意義な研究成果があがっており、関連分野における技術革新につながることを期待できる。
- (1)成果の実用化可能性
実用設備ベンダーの実施内容や既に実用プロセスとして稼動している手法については、出口イメージが明確であった。
- (2)波及効果
研究機関に対してリソース面(研究開発費)で支援するという意味では多くの機関がサポートされて、研究・開発が進展したと思う。また、本事業の支援によって、それぞれの研究分野・研究組織で専門家が育ったのが分かった。

具体的には、本事業で取り組まれた研究報告に関して、学術誌への出稿を見た。また、研究成果の反映と考えるとよいと思うが、それぞれの組織で本事業の研究従事者が責任あるポジションを獲得される例があった。

〈問題点・改善すべき点〉

- いずれもラボスケールによる研究開発成果であるので、今後、実用化に向けた技術の熟度向上努力の継続が重要となる。
- 要素技術の開発が各研究組織ごとに独立（個別）で行われていて要素技術間の関係が不明瞭で、成果を実用化につなげるための体制（グループ内での連携）がすこし不十分であった感がある。また、成果の実用化につなげる知財マネジメントが必ずしも万全に機能していない。
- 嫌気微生物処理については、研究がベンチスケール規模の試験プラントで行われていることから、実用化のイメージをつかむことが難しい。スケールアップした処理処置での研究開発に早急に取り組んで欲しい。
- いくつかの研究課題において、研究としての出口イメージおよび実用化イメージが明確にはなっていないものが見られる。残念ながらまだマイルストーンに至っていない研究課題については、是非引き続き研究開発を継続して、マイルストーンとしての結論を明確にしていきたい。
- (1)成果の実用化可能性
自然科学における「解明研究」は重要なので輩出された成果に対して敬意を評する。一方、実用化への方法論に長けてない研究者に押し並べて実用化を考えさせるのではなく、実用化を役割分担するメンバー(設備装置ベンダーなど)を受託者に選抜して役割を明示し、自然科学研究との連携や橋渡しを専従するのが単純明快だったかもしれない。

〈その他の意見〉

- ・ 計画見直しが適切に実施されていなかった。

2. 個別テーマに関する評価結果

2. 1 好気性処理

1) 研究開発成果について

個別テーマ毎に完成度に差が見られるものの、全体的には目標を達成しており、新技術の開拓に結びつく成果が得られていると評価できる。亜硝酸型硝化は、メタン発酵脱離液を処理対象に加速予算でパイロットプラントを建造し、連続実証処理試験を行い良好な処理成績を得るとともに、有用な知見を得ており、これらの成果は十分評価に値する。DHS（下降流懸垂型スポンジ）リアクタでは、3つの意欲的な目標を掲げ全ての目標を達成できていることも評価できる。また、バイオフィルム分野において、学術的に高く評価できる新規な知見を明らかにしている。

〈肯定的意見〉

- 本研究課題においては、当初の数値目標を含む目標値に対して、得られた研究の成果はそれらをクリアしていると評価できる。得られた研究の目標達成度には、研究班ごとにやや差があるとは思われるが、それは研究内容および過去になされてきた研究成果の蓄積などを反映するものであり、それら条件を加味すれば許容範囲の差であると言える。また、新たな技術の開拓に結びつく評価される研究成果を含むものがあり、今後の結実としての応用化と実用化に結びつくことを見通すことができる成果が得られている。
- 都市下水のような低濃度有機性廃水の嫌気性処理技術は途上国地域での世界潮流になりつつあるが、処理水に含まれる溶存メタンの生物学的除去（酸化処理）は温暖化防止対策として極めて重要である。広島大グループは低コストで簡易なメタン除去システムの開発に成功している。また、下水処理水からの生物学的リン除去・回収技術にも成功している。これらの成果は、世界に誇れる独創的な研究成果といえる。
- 研究開発成果は、個別テーマ毎に完成度に差が見られるものの、全体的には目標を達成しており、意義のある成果が得られている。
- いずれの個別技術も目標値を満たしている。
- (1)目標の達成度
亜硝酸型硝化テーマは目標達成されており、DHS リアクタテーマについては限定された条件範囲で目標達成される可能性ありと感じられた。
- (2)成果の意義
亜硝酸型硝化テーマと DHS リアクタは市場適用や汎用性の獲得が可能と思う。
- (3)知的財産権等の取得及び標準化の取組
国際的な競争関係上、他国で囲い込まれた技術(知財権)に対する対抗策の構築は重要な課題なので、オリジナリティ探求・創出の姿勢は評価される。
- (4)成果の普及

学術報告は十分なされたと思う。成果の受取手は学術報告やNEDO報告に注目していることから、パフォーマンスの高い成果であれば市場へのルートは開拓されると思う。

- 亜硝酸型硝化については、メタン発酵脱離液を処理対象に加速予算でパイロットプラントを建造し、pHショック法による亜硝酸型硝化の連続実証処理試験を行い良好な処理成績を得るとともに、低濃度のNH₄-N含有廃水にもこの亜硝酸型硝化処理が可能であるとの有用な知見を得ている。また菌叢解析の結果、pHショック法により、亜硝酸型硝化細菌の生育が抑制されること、pHショック法による亜硝酸型硝化処理でN₂Oの発生が抑えられるとの新規な知見を得ており、これらの成果は大いに評価できる。密閉型DHSリアクタでは、3つの意欲的な目標を掲げ全ての目標を達成できていることは評価できる。また加速予算を得て下水処理場に設置したパイロットプラントでリンの回収試験を行い、リンを10倍以上濃縮できることを明らかにしている。

〈問題点・改善すべき点〉

- 「バイオフィーム工学による微生物群デザイン化」においては先端的な研究に取り組んでいるが、「植物-根圏細菌群のデザイン化」に関しては、研究途半ばという感がある。新たな技術領域開拓につながる可能性があることから、今後の発展に期待したい。
- 難易度の高さにより期中で注力を下げた開発要素においても、どこにハードルがあったのか、なぜ克服できなかったのか、丁寧かつ誠実な総括が必要と考える。
- 好気性処理の第一課題では、前半（中間評価前の）の内生呼吸低減菌の利用による省エネルギー技術の開発課題と、後半のpHショックによる亜硝酸酸化・硝酸生成の抑制の開発課題のあいだに明確な必然性・蓋然性が見出せず、結果として前半の研究課題が途中で転じた感は拭えない。
- 各研究グループが行った微生物選択・組み合わせ技術開発の具体的例は評価できるが、選択・組み合わせ技術の全体的な内容や用途および性能等の比較を可能にするように各成果を取りまとめることが必要である。これによって、微生物利用形態としての包括固定化、付着固定化、バイオフィーム等の適用条件、特にエネルギー効率、亜酸化窒素発生削減、異種生物との共生利用などを理解できるようになれば、研究成果の活用がより広くなされるようになると考えられる。この研究課題における成果を、統合化した形で取りまとめていただくことをお願いしたい。
- バイオフィーム工学のプロジェクトでは、アンモニア酸化細菌と共生するRheinheimera属の細菌の出す物質がアンモニア酸化細菌の活性を高めていること、anammox細菌Ca. Brocadia sinicaが膜画分にhydrazine hydrolaseを顕著に生産し、これがバイオフィーム形成に活性に関係してい

るとの新規な知見を明らかにしている。これらの知見は学術的には高く評価できるが、これらの知見をどのように廃水処理の効率化に繋げるかについて道筋をつけ、実用化に結び付ける努力を期待したい。

● (1)目標の達成度

バイオフィルムテーマは現象分析に終始しており産業への発展という見方から説明不足と感じた。

(2)成果の意義

バイオフィルムテーマについては未だに「工学」と称する意味が分からない。工学とは正に市場創造を通じてメリットを追求すべきものだと思う。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

競争関係を分析しているが、ターゲット分野で突出・広範な技術囲い込みを為さねば競争力優位を確保できない。今回は、研究成果として新菌株や新たな代謝系の発見が為されたが、これらのポテンシャル(競争優位を打ち立てる力量)をいっそう育成すべきかどうかについて値踏みや目利きが早い段階で重要になると思う。ポテンシャルが高いと判断されるなら、いち早く次の開発へ進み、低ければリソース投入の再検討を行うべきではないか。

(4)成果の普及

一般向けの説明は設備ベンダーならば比較的容易に実施できるが、大学等の教育研究機関には仕組みが準備されてないかもしれない。NEDO の事業プログラムにマスコミ発表を組込まれてはどうか(プレス会見などを増やす)。

〈その他の意見〉

- 本研究において新規に取得した微生物の寄託(NITE, NBRC)一覧を公開することによって、成果の全容が理解しやすくなりかつ外部への波及効果が高まると思われる。
- 世界との競争においては、多くの既往研究例があるはず。数値の寄せ集めで「最高水準」をアピールするのではなく、真に革新的な技術・知見において成果を比較して欲しい。

2) 実用化の見通しについて及び今後に対する提言

亜硝酸型硝化、DHSリアクタについては、パイロットプラント試験で十分な研究成果を出しており、実用化イメージおよび出口イメージが明確になっている。また、廃水の微生物処理に関する新しい基礎知見とその応用方向についても成果が得られており、それらを踏まえてさらに高度な研究開発へと向かう見通しも示している。

一方、亜硝酸型硝化については、実証規模プラントあるいは実施設を用いた実用化研究の実施が望まれる。また、DHSリアクタによるリン回収については、リンの濃縮効果やその安定性、スケールアップに関する課題を検討してゆくことが重要である。バイオフィルム工学のさらなる進展のためには、出口イメージから研究コンセプトを見つめなおすことを行ってもよいのではなかろうか。

また、いずれの個別テーマにおいて、プロジェクト終了後の次の研究ステップ・開発計画に関する説明が少ない。実施者は、本プロジェクトによって得られた新規知見について、ぜひ今後も研究を継続することによって、環境技術分野において新プロセス開発へのインパクトと波及効果のある新しい技術概念として完成して欲しい。

〈肯定的意見〉

○ (1)成果の実用化可能性

包括固定化担体とpHショックの組合せは多くの既存分野に波及すると思う。リン資源回収は適用条件が合致すればコストメリットを生む可能性があるかもしれない。メタンガス等温室効果ガス排出防止は広く普及させれば一定の削減効果を発揮すると思う。

(2)波及効果

包括固定化・pHショック、DHSリアクタは普及段階である。

- 亜硝酸型硝化、密閉型 DHS リアクタについては、パイロットプラント試験で結果を出しており、出口イメージが明らかになっている。早くユーザーを見つけ、実プラント建設に繋げることを期待したい。
- 加速予算を活用した DHS パイロットプラントによるリン濃縮・回収プロセスのパイロット実験は卓越した研究成果を挙げており、十分に実用化の域に達しており、下水等の低濃度廃水からの独創的なリン回収プロセスとしてインパクトが大きい。
- 「亜硝酸型硝化」の研究開発は、生物学的窒素処理の省エネ化やアナモックス処理の安定化に大きく貢献すると思われ、好気性処理に関する個別研究テーマ中で、最も実用化に近いと考えられる。また、「DHSによるリン回収」も実用化に至れば、その効果は大きい。
- 開発技術の適用分野はよくイメージできる。
- 実用化イメージおよび出口イメージが明確である研究成果が得られている。また、廃水の微生物処理に関する新しい基礎知見とその応用方向についても

成果が得られており、それらを踏まえてさらに高度な研究開発へと向かう見通しも得られている。個々の研究課題における成果については既に実用化に至っているものがあり、環境関連バイオ技術分野への波及効果を期待することができる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 亜硝酸型硝化プロセスの開発課題では、pH ショック・プロセスの付加により酸素消費量が 25%削減出来るとしているが、pH ショック・プロセスの付加と酸素消費量 25%削減とのあいだでどちらがどの程度経済的効果があるのか相互比較が必要である。
- いずれの個別テーマにおいて、プロジェクト終了後（次の研究ステップ・開発計画）の説明が少ないのは寂しい。この部分で開発センスやストーリーづくりの真価が問われるのではないだろうか。この点も技術評価項目に含める必要があると思う。
- バイオフィルム工学のプロジェクトでは、まだまだ実用化のイメージが見えない。得られた新規な知見を如何にバイオ処理技術の効率化につなげるかが求められる。
- 本研究課題によって提案された新技術開発目標の達成については理解できるが、特に実用化に近い新技術の導入コストと経済効果についての試算結果があれば、実用化イメージおよび出口イメージがさらに明確になると思われる。
- (1)成果の実用化可能性
バイオフィルムテーマは緒についた的な実施状況であり、実用化への橋渡し者のかなりの支援が必要と思う。一方、それがコストパフォーマンス上効率的かどうかを見極める必要あると思う。
(2)波及効果
バイオフィルムテーマは出口イメージから研究コンセプトを見つめなおすことを行ってもよいのではないか。

〈今後に対する提言〉〈その他の意見〉

- ・ 「亜硝酸型硝化」については、今後、実証規模プラントあるいは実施設を用いた実用化研究の実施が望まれる。「DHS によるリン回収」については、P-DHS によるリンの濃縮効果やその安定性、スケールアップに関する課題を検討してゆくことが実用化へのステップにおいて重要である。
- ・ 本研究課題によって得られた新規知見については、ぜひ今後も研究を継続することによって、環境技術分野において新プロセス開発へのインパクトと波及効果のある新しい技術概念として完成していただきたい。

2. 2 嫌気性処理

1) 研究開発成果について

いずれの個別テーマも目標値をクリアし、一部では特に画期的な研究成果が得られている。anammox リアクタで世界最高レベルの $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度を達成し、リアクタ内に優占する anammox 細菌が *Ca. Brocadia sinica* であることを明らかにしている。また、マイクロセンサーを使って anammox グラニュール内の NH_4^+ と N_2O 濃度のプロファイルを明らかにするとともに、anammox グラニュール内での N_2O 発生は他栄養の脱窒細菌由来の可能性が高いとの有用な知見を得ており、これらの成果は学術的に高く評価できる。通電型固定床メタン発酵処理では、模擬生ごみ、下水汚泥を対象に数値達成目標をクリアしている点は評価できる。

但し、窒素除去システムの開発については、anammox の研究に使ったリアクタは小さなもので実用化が見えない状況にあり、高速の窒素除去が可能なリアクタの開発を期待する。また、除去効率の追求だけではなく、亜酸化窒素の発生抑制方策について今後の研究が必要と考えられる。通電型固定床メタン発酵処理では、なぜ通電によって微生物処理能力が高まるのかを学術的に明らかにする必要がある。

〈肯定的意見〉

○ (1) 目標の達成度

電気制御テーマの成果達成については、限定された範囲の排水処理分野で有効性を発揮すると思う。ただし、広範の嫌気処理に適用可能かどうかは不明である。ANAMMOX テーマも限定された排水処理条件で有効性を発揮すると思われる。実用化への深耕が手薄なため「50%のコンパクト化」目標は限定的にしか通用しないかもしれない。

(2) 成果の意義

投入された予算に見合った成果だと感じられた。

(3) 知的財産権等の取得及び標準化の取組

電気制御テーマは特許出願・報道数・学術発表をバランスよく実施していた。

- 二つのテーマでは、ともに画期的かつ興味深い研究開発成果が得られている。目標を達成しており、意義のある成果が得られている。
- いずれの個別技術も目標値を満たしている。
- anammox リアクタで世界最高レベルの $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度を達成し、リアクタ内に優占する anammox 細菌が *Ca. Brocadia sinica* であることを明らかにしている。また、マイクロセンサーを使って anammox グラニュール内の NH_4^+ と N_2O 濃度のプロファイルを明らかにするとともに、anammox グラニュール内での N_2O 発生は他栄養の脱窒細菌由来の可能性の高いとの有用な知見を得ている。さらに、*Ca. Brocadia sinica* の生理学的特性を明らかにするとともに、メタゲノム解析を行い *Ca. Brocadia sinica* の窒素代謝経路

の推定を行っている。これらの成果は学術的に高く評価することができる。新規な通電型固定床メタン発酵槽に関するテーマでは、模擬生ごみ、下水汚泥を対象に既設の 3 倍の有機物負荷量で安定して処理できることを明らかにしている点は高く評価できる。

- アナモックス細菌のメタゲノム解析からの窒素代謝経路の推定や、分子生物学的手法やマイクロセンサーによる微生物群集解析などの先端的な学問的成果のみならず、実用化研究でも世界最高の窒素除去速度を達成し、さらに実廃水を用いた実証試験でも $9.0\text{kgT-N/m}^3/\text{d}$ を達成するなど世界に誇れる研究成果を上げて、実用化に向けて大きく前進している。
- メタゲノム解析等の新規な微生物生態系解析技術および新規に導入したマイクロセンサー技術は、今後の微生物群のデザイン化にとって必須とされるツールと考えられる。それらの進歩を伴う特定微生物の定量的把握と廃水処理微生物群生態系の高度な解析を行い、それを基にして微生物群のデザイン化による高効率廃水処理プロセスの開発を実現するという目的は達成されていると評価できる。また、メタン発酵についても申請時の数値達成目標をクリアしていると評価できる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 「高効率固定床式メタン発酵」では、中間評価時に通電によるメタン発酵効率向上の原理を解明するよう指摘されていた。その後の研究では、細菌の群集解析を実施しているが、原理そのものが完全に解明されているとは言えない状況である。更なる効率化のためにも原理の解明は重要であろう。
 - 窒素除去プロセスの開発については、除去効率の追求だけではなく、亜酸化窒素の発生抑制方策について今後の研究が必要と考えられる。電極固定床メタン発酵プロセスの開発については、電極とそれへの通電の効果が微生物活性とどのように関連することによってもたらされるものであるかを、微生物生理の観点から明確にする必要があると考えられる。
 - 通電型固定床メタン発酵リアクタの開発課題では、模擬ゴミを用いた連続実験では $89\text{ kgCOD/m}^3/\text{d}$ と高速処理能力を達成したものの、連続実験期間のツメが甘く（実験期間が短い）、多分に瞬間風速の感は拭えない。また、有機物の除去率（あるいはガス回収率）も満足できるレベルにはない。
 - **anammox** の研究に使ったリアクタはプラグフロー型の容量 150mL の小さなもので、これでは実用化が見えない状況にある。高速の窒素除去が可能なリアクタの開発を期待したい。また部分亜硝酸化した消化脱離液の実排水の処理では原液での処理が行われていない点に課題が残っている。
- 通電型固定床メタン発酵処理でなぜ、通電によって処理能力が高まるのかを学術的に明らかにする必要がある。この点が明らかにできれば、更なる処理の効率化を期待することができる。今後、通電に適したリアクタの形状についても検討するとともに、スケールアップした処理装置での検討を行う必要

がある。

● (1)目標の達成度

肯定的意見に同じ。

(2)成果の意義

いずれの個別課題も、市場拡大や汎用性獲得には、今後、実用化課題に精力的に取り組むべきではないか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

ANAMMOX については特許出願・報道が行われていない。NEDO 推進部門が研究担当者に対して指導・相談支援を施すメニューを組込むのがよいかもしれない。

(4)成果の普及

電気制御テーマについては、限定された分野への適用に留まりそうに感じた。生ゴミ処理を想定した開発(成果の受取手)が妥当だったかについて、十分な説明がされたように感じなかった。

ANNAMOX 分野は省エネ観点や新規処理法としては研究段階(Research 段階)であり学術発表に偏ることは否めないが、研究支援の幅を広げて開発を加速するためには、一般向けの情報コミュニケーション量を増やすのが効果的かもしれない。

〈その他の意見〉

- ・ 担体への通電と微生物群担体の付加によって高い有機物負荷を許容して発酵槽のコンパクト化を目指す技術開発であるが、酸化還元電位が低くなる(より還元側になる)という現象論で終わっており、残念ながらそのメカニズムの解明には至っていない。

2) 実用化の見通しについて及び今後に対する提言

生物処理プロセスの微生物生態系解析技術の分野において優れたいくつかの手法開発を行っており、それらの手法は当該分野の多くの微生物群解析に応用可能である。

しかし、実施された研究は、いずれもベンチスケールレベルのものである。部分硝化-anammox リアクタについては基礎研究であることから、応用研究を実施した上で、スケールアップが可能か検討を行う必要がある。通電型固定床メタン発酵処理については、スケールアップして各プロセスの性能の評価を行う必要がある。その上で、技術としての出口イメージとして、初期投資および維持管理費等の費用とそれによる効果との比較の点で実現可能かどうかについて、判定がなされる必要がある。

現在研究に使っている anammox リアクタではスケールアップが難しく、優占する anammox 細菌の特性を生かしたリアクタの開発が必要である。また、実用化には anammox 汚泥の大量培養が必要であるが、これについての検討も必要である。通電型固定床メタン発酵処理では、固形性有機物の可溶化反応が律速となることが予想され、電極近傍での酸化還元電位の人為的制御のみでは高効率化に対して、いまだ解決すべき技術的問題点が多く残されている。

〈肯定的意見〉

- ANAMMOX プロセスは基盤研究のみならず、二段ステップ流入方式の上向流リアクタの開発に成功しており、実用化のイメージが明確になっている。
- (1)成果の実用化可能性
電気制御についてはスケールアップ試験の成功が実用化や出口イメージの決め手になる。今後、適用分野のパイロット試験への道筋を追求していただきたい。
- (2)波及効果
実施主体の人材育成姿勢を学術発表(投稿論文等)から窺い知ることができた。技術波及のために、各研究機関におかれては、産業分野との連携を深める施策実施を継続されるよう期待する。
- 本研究課題では、生物処理プロセスの微生物生態系解析技術の分野においてすぐれたいくつかの手法開発を行っており、それらの手法は当該分野の多くの微生物群解析に応用可能である。また、並列窒素除去プロセスや電極式バイオリクターといった新規バイオリクターの開発に取り組み、それらの基本型式を提案した点は評価できる。さらに、それらの最適操作条件を決定するに至っている点も評価できる。
- 「高効率固定床式メタン発酵」の研究開発は、実用化はかなり近いと期待できる成果が得られている。また、「アナモックス反応」に関する研究では、実際の消化脱離液をアナモックスプロセスで処理し、高い窒素除去速度が得られている。

- 開発技術の適用分野はよくイメージできる。
- いずれの課題も、研究開発を通じて新規な有用な知見が得られている。これらの有用な知見を実用化に生かすにはまだまだ克服しなければならない問題点が多いが、これまでの常識を打ち破る可能性を秘めている有用な知見が得られているので、実用化を視野に入れた今後の研究開発に期待したい。

〈問題点・改善すべき点〉

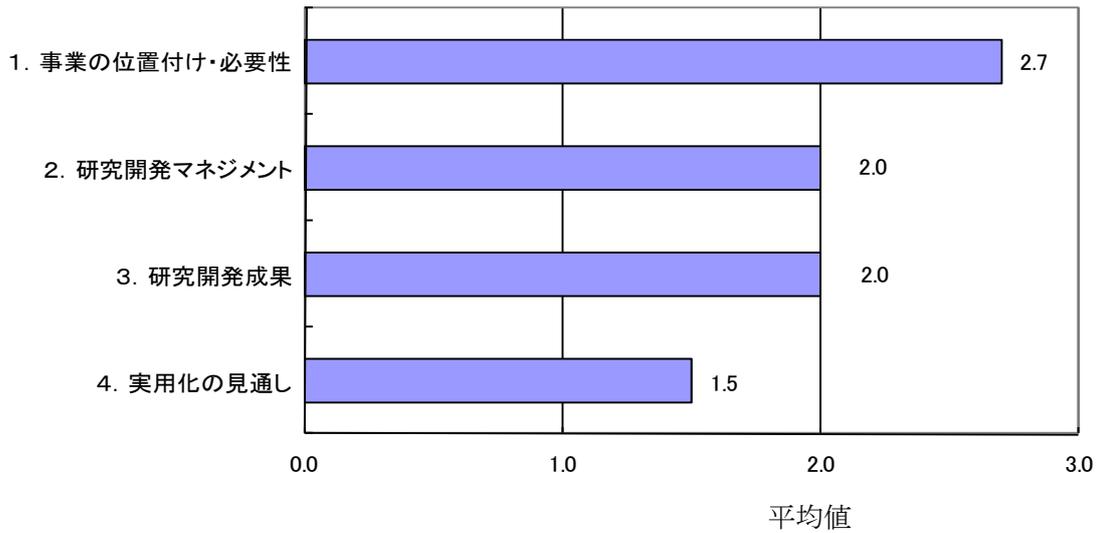
- 通電型メタン発酵槽の研究課題では、固形性有機物の可溶化反応が律速となることが予想され、電極近傍での酸化還元電位の人為的制御のみでは高効率化に対して、いまだ解決すべき技術的問題点が多く残されている。
- いずれの個別テーマにおいて、プロジェクト終了後（次の研究ステップ・開発計画）の説明が少ないのは寂しい。この部分で開発センスやストーリーづくりの真価が問われるのではないだろうか。この点も技術評価項目に含める必要があると思う。
- 現在研究に使っている anammox リアクタではスケールアップが難しい。優占する anammox 細菌の特性を生かしたリアクタの開発が必要である。また、anammox 汚泥の大量培養が実用化には必要であるが、これについての検討も必要である。
- (1)成果の実用化可能性
ANAMMOX テーマについては、装置工学的な観点から協働先の探索や連携を早期にされるのがよいと思う。二段ステップリアクタがスケールアップに堪える装置に開発されるかどうか見極めが必要と感じた。
- 「アナモックス反応」に関する研究については、実用化という視点からは、実際の消化脱離液を本研究において開発されたアナモックスプロセスにより処理する場合の安定性の確認が重要である。
- 本課題で実施された研究は、いずれもベンチスケールレベルのものであることから、さらにそれらの処理システムをスケールアップして各プロセスの性能の評価を行う必要がある。その上で、技術としての出口イメージとして、初期投資および維持管理費等の費用とその効果の点で実現可能かどうかについて、判定がなされる必要がある。すなわち、研究としての出口イメージおよび実用化イメージが明確になっていないものが一部見られることから、まだマイルストーンに至っていない研究については、ぜひ引き続き研究開発を継続し、マイルストーンとしての中間的成果を今後明確にしていきたい。

〈今後に対する提言〉〈その他の意見〉

- ・ 「高効率固定床式メタン発酵」は、その早期の実用化が期待されるが、その上では、原理の解明に加え、プロセスの最適化の検討が望まれる。

3. 評点結果

3. 1 プロジェクト全体



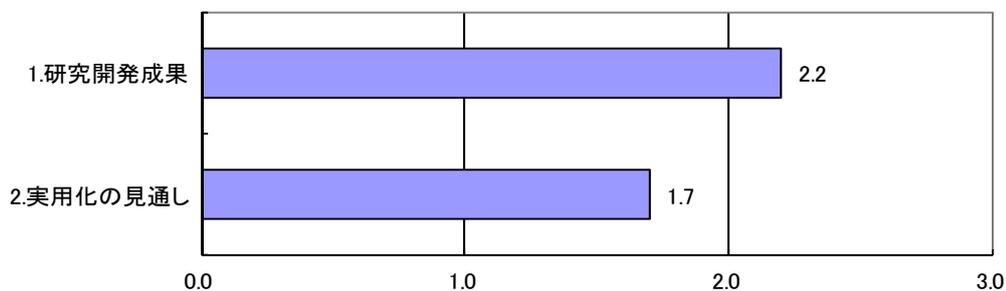
| 評価項目 | 平均値 | 素点 (注) | | | | | |
|--------------------|-----|--------|---|---|---|---|---|
| | | A | A | B | A | A | B |
| 1. 事業の位置付け・必要性について | 2.7 | A | A | B | A | A | B |
| 2. 研究開発マネジメントについて | 2.0 | B | A | B | D | A | B |
| 3. 研究開発成果について | 2.0 | B | B | B | C | A | B |
| 4. 実用化の見通しについて | 1.5 | C | B | C | B | B | C |

(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

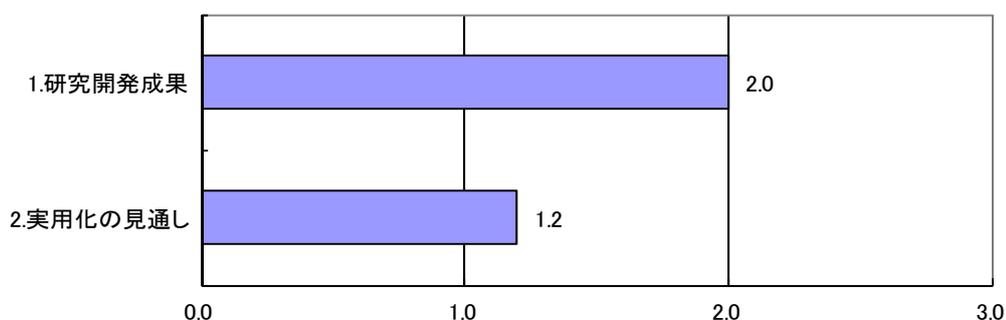
| | | | |
|--------------------|----|----------------|----|
| 1. 事業の位置付け・必要性について | →A | 3. 研究開発成果について | →A |
| ・非常に重要 | →A | ・非常によい | →A |
| ・重要 | →B | ・よい | →B |
| ・概ね妥当 | →C | ・概ね妥当 | →C |
| ・妥当性がない、又は失われた | →D | ・妥当とはいえない | →D |
| 2. 研究開発マネジメントについて | →A | 4. 実用化の見通しについて | →A |
| ・非常によい | →A | ・明確 | →A |
| ・よい | →B | ・妥当 | →B |
| ・概ね適切 | →C | ・概ね妥当であるが、課題あり | →C |
| ・適切とはいえない | →D | ・見通しが不明 | →D |

3. 2 個別テーマ
 3. 2. 1 好気性処理



平均値

3. 2. 2 嫌気性処理



平均値

| 個別テーマ名と評価項目 | 平均値 | 素点 (注) | | | | | |
|----------------|-----|--------|---|---|---|---|---|
| 3. 2. 1 好気性処理 | | | | | | | |
| 1. 研究開発成果について | 2.2 | B | A | B | C | A | B |
| 2. 実用化の見通しについて | 1.7 | B | B | B | C | B | C |
| 3. 2. 2 嫌気性処理 | | | | | | | |
| 1. 研究開発成果について | 2.0 | B | B | B | C | A | B |
| 2. 実用化の見通しについて | 1.2 | C | B | C | C | C | C |

(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果について

- ・非常によい
- ・よい
- ・概ね適切
- ・適切とはいえない

2. 実用化の見通しについて

- A ・明確 →A
- B ・妥当 →B
- C ・概ね妥当であるが、課題あり →C
- D ・見通しが不明 →D

第2章 評価対象プロジェクト

1. 事業原簿

次ページより、当該事業の事業原簿を示す。

「微生物群のデザイン化による
高効率型環境バイオ処理技術開発」
(事後評価)第1回分科会
資料5

「微生物群のデザイン化による
高効率型環境バイオ処理技術開発」

事業原簿【公開】

| | |
|-----|--|
| 担当部 | 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部 |
|-----|--|

—目次—

概要

プロジェクト用語集

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性…………… I-1
 - 1.1 NEDOが関与することの意義
 - 1.2 実施の効果(費用対効果)
2. 事業の背景・目的・位置づけ…………… I-2

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標…………… II-1
2. 事業の計画内容…………… II-2
 - 2.1 研究開発の内容
 - 2.2 研究開発の実施体制
 - 2.3 研究の運営管理
3. 情勢変化への対応…………… II-3
4. 中間評価結果への対応…………… II-4
5. 評価に関する事項…………… II-5

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果…………… III-1
2. 研究開発項目毎の成果…………… III-2

IV. 実用化の見通しについて

- 実用化の見通しについて…………… IV

(添付資料)

- ・イノベーションプログラム基本計画
- ・プロジェクト基本計画
- ・事前評価関連資料(事前評価書)
- ・特許論文リスト

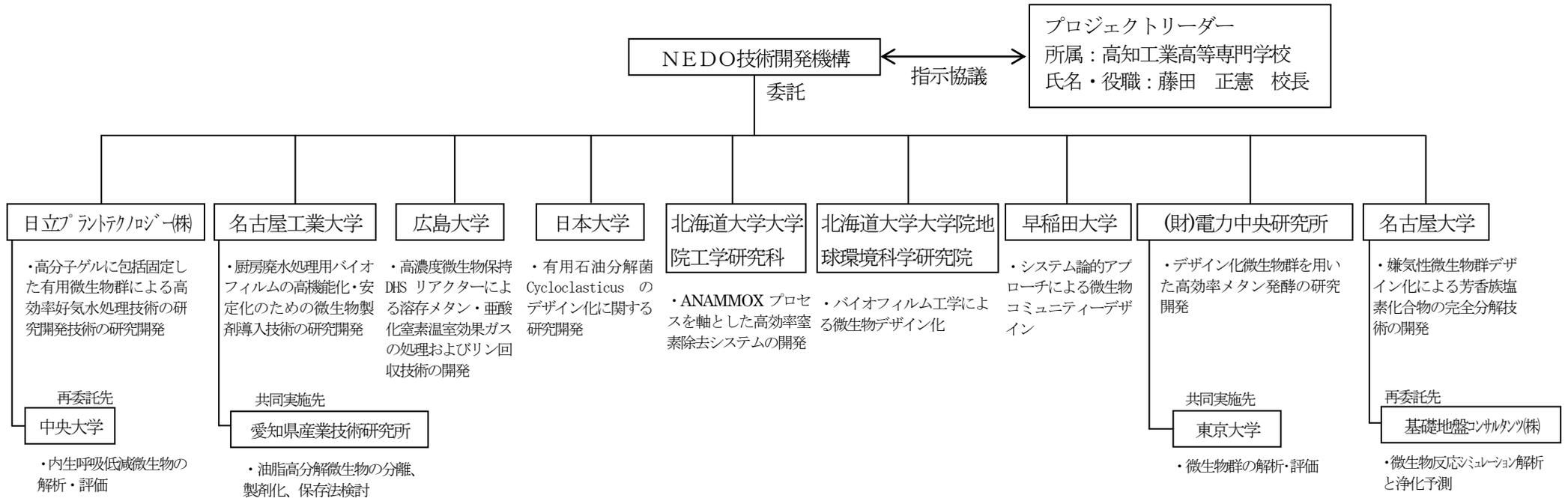
概要

作成日 平成24年4月

| | | | | | | | |
|--------------------|--|----------|--------|-------|-------|-------|---|
| プログラム（又は施策）名 | 生物機能活用型循環産業システム創造プログラム | | | | | | |
| プロジェクト名 | 微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発 | プロジェクト番号 | P07024 | | | | |
| 担当推進部/担当者 | バイオテクノロジー・医療技術部 主査 長谷川 義基(H.21年度から事後評価まで) | | | | | | |
| 0. 事業の概要 | <p>従来の産業における廃水・廃棄物処理技術は、①エネルギー多消費・廃棄物多排出、②低処理能力・対象廃棄物限定等といった課題を抱えている。これまで、このような課題に対し様々な工学的アプローチによる高度化はなされてきたものの、微生物群自体については、依然としてブラックボックスのままであり、自然の摂理の域を出ていないと考えられる。このため、特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術（これらの技術を「デザイン化技術」と呼ぶ）等を開発することにより微生物群の処理効率を大幅に向上させるなど、処理技術の課題を克服することが必要とされている。</p> <p>そこで本事業では、我が国の有する知見を活かしつつ、微生物群のデザイン化技術等を開発することにより、省エネルギーで余剰汚泥の大幅削減、コンパクトで容易なメンテナンス、あるいは多様な廃水・廃棄物への適用が可能な高効率型廃水、廃棄物処理（主として活性汚泥法・メタン発酵法を対象）の基盤技術を確認し、生物機能を活用した環境調和型産業システムの創造に資する技術を開発する。</p> | | | | | | |
| I. 事業の位置付け・必要性について | <p>「生物機能活用型循環産業システム創造プログラム」は、工業プロセスや環境関連分野へのバイオテクノロジーの利用を促進することにより、生物機能を活用した高度モノ作り社会の構築を図りつつ、廃棄物、汚染物質等の生分解・処理技術の高度化を通じ、環境に調和した循環型産業システムの創造を図るものである。本事業は上記プログラムの一環として、「生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発／微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術」を開発する。</p> | | | | | | |
| II. 研究開発マネジメントについて | | | | | | | |
| 事業の目標 | <p>①好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発 特定有用微生物（群）を、人為的に安定導入・維持するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価する技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスでのエネルギー使用量の約2/3の削減を図ること。さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。</p> <p>②嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発 特定有用微生物（群）を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価するための技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来のメタン発酵プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、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の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大を可能とすること。さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。</p> | | | | | | |
| 事業の計画内容 | 主な実施事項 | H19fy | H20fy | H21fy | H22fy | H23fy | |
| | 好気性微生物処理技術における特定有用微生物(群)を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発 | | | | | | → |
| | 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発 | | | | | | → |

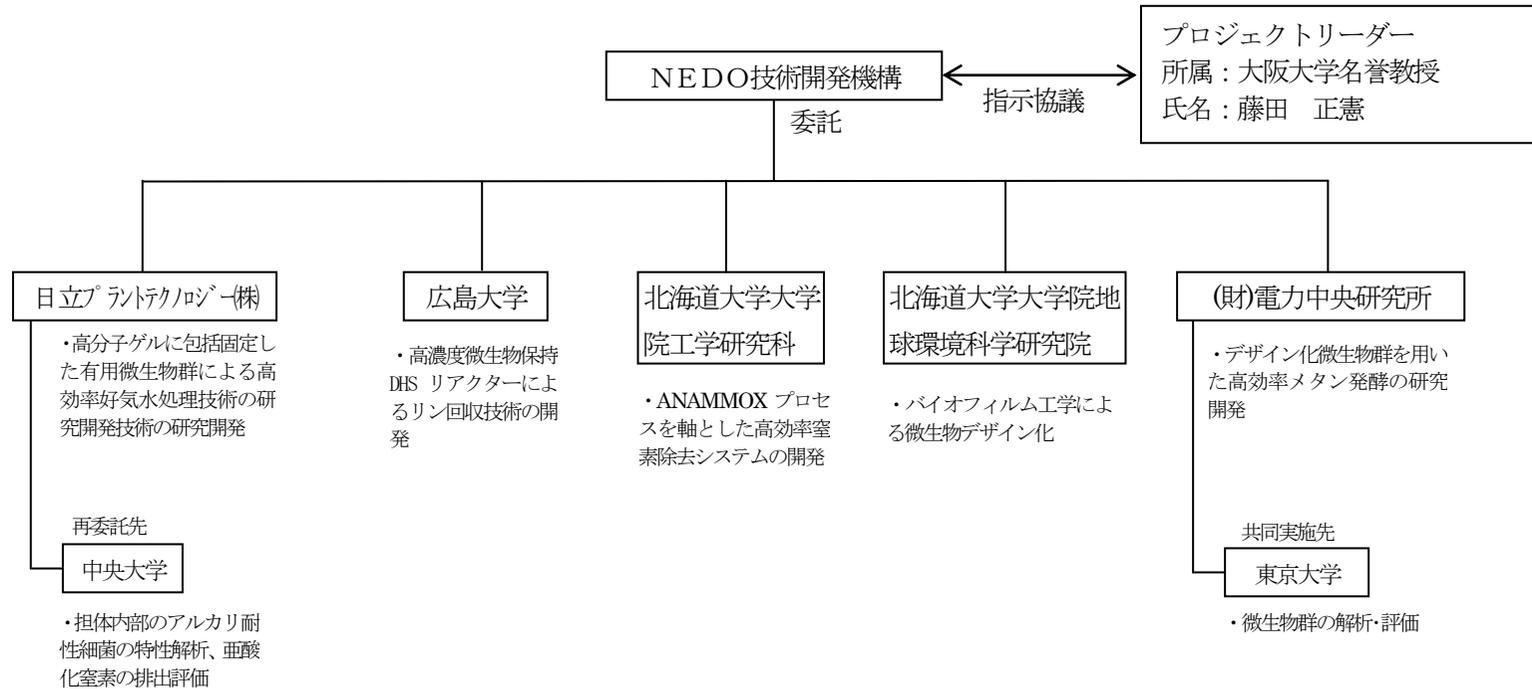
| 開発予算 (会計・勘定別に事業費の実績額を記載) (単位：百万円) | 会計・勘定 | H19fy | H20fy | H21fy | H22fy | H23fy | 総額 |
|---|--|--|-------|-------|-------|-------|-----|
| | 特別会計(需給) | 188 | 154 | 114 | 73 | 101 | 630 |
| | 加速予算 | | 38 | 57 | 35 | | 130 |
| | 総予算額 | 188 | 192 | 171 | 108 | 101 | 760 |
| 開発体制 | 経産省担当原課 | 製造産業局生物化学産業課 | | | | | |
| | プロジェクトリーダー | 藤田正憲 大阪大学名誉教授 | | | | | |
| | 委託先(*委託先が管理法人の場合は参加企業数も記載) | [全期間](株)日立プラントテクノロジー, 広島大院工学研究科, 北海道大院工学研究院, 北海道大院地球環境科学研究所, (財)電力中央研究所 [~H21fy]名古屋工業大院工学研究科, 日本大生物資源科学部, 早稲田大ナノ理工学研究機構, 名古屋大エコトピア科学研究所 | | | | | |
| 情勢変化への対応 | 研究の進捗に伴い、追加的資金配分、またプロジェクト内の連携体制を構築した。また、中間評価後に実施体制を変更した。 | | | | | | |
| Ⅲ. 研究開発成果について | <p>① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物(群)を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発 曝気量とメタノール添加量の削減需要が見込まれる消化汚泥脱水ろ液、産業排水処理に向けて、硝酸化抑制技術を用いた窒素除去システムを開発した。 実下水を用いてリン除去・回収 DHS リアクターの開発を行った。 バイオフィルム工学による活性汚泥法の効率化・安定化を目指し、具体的には硝化槽の性能の鍵となるアンモニア酸化細菌および Anammox 菌についてその特性をバイオフィルム形成の点から理解し、バイオフィルム形成による安定化を行った。 [実施体制：株式会社日立プラントテクノロジー(再委託：中央大学)、広島大学大学院工学研究科、北海道大学大学院地球環境科学研究所]</p> <p>② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発 Anammox プロセスについて最適条件の検討、Anammox 細菌のメタゲノム解析を行った。 固定床(担体)メタン発酵による安定化と電気による微生物群の制御技術の開発、およびこれらの組合せによる効率的なメタン発酵処理技術の開発を行った。 [実施体制：北海道大学工学研究科、電力中央研究所(共同実施：東京大学)]</p> | | | | | | |
| | 投稿論文 | 論文発表 47 件、口頭発表 148 件、新聞・プレス・受賞等 12 件 | | | | | |
| | 特許 | 「出願済」7 件(内外国出願 0 件) | | | | | |
| | Ⅳ. 実用化の見通しについて | 本事業では、開発したデザイン化技術やデザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を組み合わせることにより処理の高効率化を図るのに加えて、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模での評価を行うなど実用化の推進に取り組んだ。 | | | | | |
| Ⅴ. 評価に関する事項 | 事前評価 | 18 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術開発部 | | | | | |
| | 中間評価以降 | 21 年度 中間評価実施 24 年度 事後評価実施 | | | | | |
| Ⅵ. 基本計画に関する事項 | 作成時期 | 19 年 3 月 作成 | | | | | |
| | 変更履歴 | 20 年 7 月 変更 研究開発の目的」の記載を改訂 | | | | | |
| | | 22 年 3 月 変更 研究開発の目標を改訂 | | | | | |
| | | 23 年 7 月 根拠法を改訂 | | | | | |

「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」実施体制（平成 19-21 年度）



(別紙) 本事業の実施体制図

「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」実施体制 (平成 22-23 年度)



プロジェクト用語集

| 用語 | 用語の解説 |
|------------------|---|
| 内生呼吸 | 細胞内の構成成分を自ら分解してエネルギーを獲得し、生命を維持するための呼吸。 |
| 内生呼吸低減菌 | 内生呼吸量が少ない菌。細胞内の構成成分(グリコーゲンなど)の蓄積が少ない菌や構成成分分解活性欠損菌などが、内生呼吸が少ない内生呼吸低減菌であると考えられる。 |
| 硝化 | 排水中のアンモニア性窒素が酸化され亜硝酸/硝酸性窒素を生成する反応。この反応を司る菌が硝化細菌(アンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌)である。 |
| アンモニア酸化細菌 | アンモニア性窒素を酸化し亜硝酸性窒素を生成する独立栄養細菌。亜硝酸菌とも云う。 |
| 亜硝酸酸化細菌 | 亜硝酸性窒素を酸化し硝酸性窒素を生成する独立栄養細菌。硝酸菌とも云う。 |
| 包括固定化微生物担体 | 有用菌をゲル内部に封じ込めた担体。ゲル内部で菌が増殖し高濃度の菌を保持できる。廃水処理槽で担体を流動させ、廃水と接触させ、廃水を処理する。 |
| N ₂ O | 亜酸化窒素。窒素酸化物の一種。二酸化炭素の約210倍もの温暖化係数を持つ温室効果ガスであり、温室効果ガス排出削減の対象物質である。 |
| 嫌気メタン酸化 | 嫌気条件下におけるメタンの酸化分解。嫌気条件下でのメタンの分解には、嫌氣的メタン酸化古細菌と呼ばれる微生物が関わっていると考えられている。しかしながら、微生物の純粋培養株が得られておらず、メタン代謝機構等はよくわかっていない。 |
| DHS | 下向流懸垂型スポンジ(Downflow Hanging Sponge)の略。DHSはポリウレタンスポンジを固定担体とした生物膜型の排水処理装置である。DHSはエアレーションを必要としないことや余剰汚泥がほとんど発生しないといった経済面でのメリットに加え、メンテナンスフリーでコンパクト性を合わせ持ち、極めて良質な処理水を安定的に得ることが可能である。 |
| HAP法 | 排水中のリンをヒドロキシアパタイト(HAP)の結晶として液中より回収する方法。晶析法の一つ。リンを含む排水に塩化カルシウム、水酸化ナトリウム及び脱リン剤を添加し過飽和状態にする事で、リンをHAPの結晶として回収する。 |
| PAO | ポリリン酸蓄積細菌(Polyphosphate-Accumulating Organisms)の略。 |
| ポリリン酸蓄積細菌 | 菌体内にポリリン酸を蓄積する細菌。特に、嫌気条件下において酢酸などの有機物を摂取し、好気条件下においてリンを菌体内に取り込み蓄積するポリリン酸蓄積細菌は、下水処理における生物学的リン除去において重要な役割を果たしていると考えられている。 |
| MAP法 | 排水中のリンをアンモニアとマグネシウムとの反応によって生成するリン酸マグネシウムアンモニウム(MAP)の結晶として液中より回収する方法。リンを含む排水に塩化マグネシウムや水酸化ナトリウム等を添加し過飽和状態にする事で、リンをMAPの結晶として回収する。 |
| メタン酸化細菌 | メタンをエネルギー源・炭素源として用いて生育する微生物。メタン酸化細菌と言った場合、一般的には酸素を用いてメタンを酸化する好気性細菌を指す。メタン酸化細菌とも呼ばれる。 |
| 固定床メタン発酵 | 槽内に担体を浸漬させることにより、担体表面上に微生物群を付着させ、その微生物群によって行う方式のメタン発酵法。 |
| 有機性廃棄物 | 炭素の酸化物や金属の炭酸塩などを除く炭素化合物からなる廃棄物。食品系廃棄物(生ごみ)などが該当する。 |
| 模擬廃棄物 | 実験を実施するにあたり、人工的に作製した廃棄物。 |
| デザイン化微生物群担体 | 有用菌が優占化し安定性を保持している微生物群集が担体表面上に付着している人工的に構築した担体のこと。 |
| 古細菌 | 生物群の一つであり、その分類の中にはメタンガスを生成するメタン菌が含まれる。 |
| PCR-DGGE法 | ポリメラーゼ連鎖反応 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の略。微生物群集構造解析法の一つで、培養せずに多数の微生物を一度に検出することができ、ゲル上で分離された各バンドが各微生物に対応する。 |
| 担体 | 反応槽内でメタン発酵を行うにあたり、微生物を表面上に付着させるための土台となる板や繊維のこと。 |
| T-RFLP法 | 末端制限断片長多型解析の略。微生物群集構造解析法の一つで、培養せずに細菌種を比較することが可能である。本手法は、微生物群集の比較解析を行う上で、高感度と高処理能力を有している。 |

| | |
|---------------|---|
| 有機物負荷量(OLR) | 反応槽内に投入する、単位時間、単位容積当たりの有機物の添加量。単位は、gCOD/L/日。 |
| 水理的滞留時間(HRT) | 反応槽内の内容物が完全に入れ替わるのに要する時間のこと。 |
| 低級脂肪酸(VFA) | 長鎖炭化水素の1価のカルボン酸のうち、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の炭素数が少ない揮発性の脂肪酸。 |
| 化学的酸素要求量(COD) | 被酸化性物質(有機性物質)を酸化するために必要となる酸素量のことで、有機物濃度の指標となる。 |
| 浮遊固形分(SS) | 試料をろ過し、ろ過材上に残留した物質を105°Cで乾燥したときに残留した物質のこと。 |
| クローン解析 | 解析対象のDNA断片群を解読し、得られた塩基配列を既にデータベースに登録されている配列と照合することで、試料中の微生物の種類と割合を推定する |
| ゲノムDNA | 菌体や環境試料から抽出した微生物(群)の全遺伝子。 |
| T-RF(制限断片) | T-RFLP解析において制限酵素で切断された1つのDNA断片のこと。波形データ中では1つのピークを指す。 |
| bp | 塩基対:base pairの略で、塩基配列の長さを示す単位。 |
| TAクローニング法 | 目的の遺伝子を増幅して単離する方法のこと。Taq DNA合成酵素を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、解析対象のDNA断片群の末端にアデニン(A)を1塩基付加する。これを末端にチミン(T)を1塩基付加した核酸分子に導入し、大腸菌を用いて核酸分子ごと目的の遺伝子を増幅して単離する。 |
| ライブラリ | 解析対象の遺伝子群の断片が1つ1つ個別の核酸分子内に導入されているものの集合物。 |
| 系統学的解析 | 解析対象の遺伝子を解読することで得られた塩基配列を他と比較し、その違いの割合から進化・系統の関係を推測して分類する解析法。 |
| クローン | 解析対象の遺伝子の単離を目的として得られた、同一の塩基配列を持つ均一なDNA断片群のこと。 |
| 酢酸資化性メタン菌 | 嫌気条件でメタンを生成する古細菌の中で、特に酢酸をメタンと二酸化炭素に変換することで生育するメタン菌のこと。 |
| 通電 | 電気をかけて反応槽内の2本の電極間(作用極と対極)で電流を通すこと。 |
| 作用極 | 反応槽内の電極のうち、目的とする電位に設定される電極のこと。 |
| 参照電極 | 反応槽内の作用極を目的とする電位に設定するにあたり、電位の基準点を与える電極のこと。従って、電位を制御する際には、作用極と参照電極間の電位を制御することになる。 |
| 電位 | 反応槽内における酸化還元反応系において、電子の放出しやすさ、電子の受け取りやすさを定量的に評価する尺度のこと。 |
| 対極 | 反応槽内の電極のうち、作用極の対となる電極のこと。電流を作用極に流すためには必ず必要となる。 |
| アノード | 酸化反応が生じる電極のこと。外部回路へ電子が流れ出す電極のこと。 |
| カソード | 還元反応が生じる電極のこと。外部回路から電子が流れ込む電極のこと。 |
| ランダムクローン | 解析対象の遺伝子群を単離する際に形成された大腸菌の集団から非特異的に選抜すること、またはそうして得られたDNA断片のこと。 |
| シーケンス | DNAを構成する塩基配列(ヌクレオチドの並び順)を決定すること。 |
| BLAST | DNAの塩基配列またはタンパク質のアミノ酸配列をデータベースに既に登録されている配列と比較するための計算を自動的に行うプログラムのこと。 |
| 相同性検索 | 解析によって得られた遺伝子配列をデータベースに既に登録されている配列と比較し、その類似度を求めること。 |
| 配列 | 実験によって得られた、DNAを構成する塩基の並び順のこと。 |
| 水素資化性メタン菌 | 嫌気条件でメタンを生成する古細菌の中で、特に水素と二酸化炭素をメタンに変換することで生育するメタン菌のこと。 |
| メタン発酵 | 嫌気性微生物の分業により高分子の有機物を徐々に低分子化し、最終的にメタン生成古細菌が酢酸、二酸化炭素、ギ酸からメタンを生成する反応。メタンはバイオガスとしてエネルギー回収できる。家畜糞尿などの有機性廃棄物をメタンへ変換が可能のため、バイオマス資源の有効利用の観点から近年注目されている。メタンの化学式からわかるように排水中の窒素源については全く除去できないのが欠点である。メタン回収後の消化液は高濃度のアンモニアを含むため、浄化処理が必要となる。 |

| | |
|----------------------------------|---|
| 嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)およびアナモックスリアクター | 嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)反応は嫌気性条件下でアンモニアを電子供与体、亜硝酸を電子受容体として窒素ガスへ変換する反応であり、省エネルギーかつ副産物の生成がない理想的な微生物反応($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 \uparrow + 2\text{H}_2\text{O}$)である。しかしながら、アナモックス反応を担う細菌は培養が非常に困難であるため、集積培養の報告例は極めて少なく、これまでに環境中から分離した事例はなく、窒素除去プロセスとして実用化例はない。本プロセスで使用するアナモックスリアクターは上向流の嫌気性固定床リアクターである。微生物担体には不織布および園芸用のネットを用いる。 |
| 部分硝化反応 | 硝化反応とは、廃水中のアンモニウムイオンを亜硝酸、さらには硝酸まで酸化する反応である。自然界では通常硝酸まで完全に酸化され、亜硝酸が蓄積することはない。しかしながら、アナモックス細菌は電子受容体として硝酸を用いることはできず、亜硝酸のみを利用可能なため、廃水中のアンモニアを亜硝酸に酸化し、亜硝酸から硝酸への酸化反応を抑制しなければならない。このように硝化反応を部分的に起こすことを部分硝化反応という。亜硝酸酸化反応の抑制方法としては、温度、pHのコントロールが知られている。 |
| 16S rRNA遺伝子系統解析 | 複合環境微生物サンプルからDNAを抽出し、その16S rRNA遺伝子の塩基配列を解読する。解読した16S rRNA遺伝子配列は、データベース上の既知の微生物の16S rRNA遺伝子配列と同一性を比較することにより環境微生物の系統分類学的位置を推定できる。微生物群集構造の解析には不可欠な手法となっている。環境微生物の環境中における機能についての直接的な情報は得られないが、近縁な分離株の機能情報を基に推定することができる。但し、これまで分離培養された微生物は現存種全体の約1%と見積もられていることから、近縁な分離株の機能情報と一致するとは限らない。 |
| FISH法 | Fluorescence in situ hybridization (FISH)法、生体内原位ハイブリダイゼーション法の略。検出したい微生物に特異的な遺伝子の配列部位に相補的に結合する合成遺伝子プローブ(オリゴヌクレオチド)を設計する。そのプローブに蛍光色素を付加した蛍光遺伝子プローブを、調査したい環境微生物群集に適用し、ある一定の温度、イオン強度条件下でプローブと、細胞膜を破碎せずに微生物細胞内の検出対象の標的遺伝子部位をハイブリダイゼーション(相補結合)させる。最終的に試料を蛍光顕微鏡観察することで、プローブの結合した細胞を同定・定量する技術。プローブの設計しだいで、種レベル、属レベル、またはそれ以上のレベルで目的とする微生物の検出が可能。培養を介さないため短時間で結果が得られ、培養困難な微生物も検出できるため、環境サンプルのような複合微生物系の群集構造を把握する手法として用いられている。 |
| MAR-FISH法 | 微生物細胞を対象とした放射性同位体元素を用いたラベル化法であるマイクロオートラジオグラフィ(Microautoradiography)と蛍光in situ ハイブリダイゼーション(FISH)を組み合わせた方法。放射性同位元素で標識された特定基質の微生物細胞レベルでの取り込みを、写真感光剤の被膜の感光によって検出し、同時に微生物の同定を行うことができる。複合微生物系内で特定の物質を利用(分解)している微生物を解析する手法として極めて有用である。 |
| バイオフィーム | (固体表面あるいは界面に付着した)微生物細胞群が形成する高次構造体。細胞は多糖類や核酸などの生体高分子物質に覆われ、物理的・化学的・生物学的に高いストレス耐性を獲得する。バイオフィーム内では微生物間相互作用が頻繁におこるため、浮遊細胞とは異なったさまざまな特徴が発現する。 |
| 根圏 | 根表面および根から0.1ミリメートル程度内の範囲。根圏では微生物-植物間相互作用が頻繁におこる。 |
| 浮遊細胞 | バイオフィーム状態ではなく、溶液中に分散して浮遊しながら生育する単独細胞 |
| ANAMMOX | 嫌気条件下で進行するアンモニア酸化反応(ANAerobic AMMonia OXidation)。その原因細菌をANAMMOX細菌(嫌気性アンモニア酸化細菌)と呼ぶが、いま純粋培養には成功していない。 |
| フェノール、ナフタレン | いずれも有害な芳香族炭化水素化合物であり、環境汚染物質でもある。 |
| Acinetobacter, Pseudomonas | いずれも環境汚染物質を効率良く分解できる細菌属。 |

| | |
|------------------------|---|
| ヘルパー細菌 | 活性汚泥中に含まれるアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌などの安定化および活性化に関与する未知の細菌。この細菌数を増やすことで間接的にアンモニア除去効率の向上が期待できる。 |
| ヒンダー細菌 | ヘルパー細菌とは対照的にアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌などを不安定化あるいは生育阻害する未知の細菌。この細菌数を減ずることで間接的にアンモニア除去効率の向上が期待できる。 |
| バイオフィリアサドル、 バイオステージ | 微生物を付着させるために市販されている樹脂製担体。 |
| SDS-PAGE | タンパク質変性剤を含む、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法。細胞に含まれるタンパク質を解析するための常法で、分子量の違いにより分離する方法。 |
| 微生物グラニューール | 微生物自身の凝集作用によって形成された微生物造粒(凝集)体で、一般的に粒径0.2mm以上のものを指す。嫌気性細菌を主な構成微生物とする嫌気性グラニューールが有名であるが、近年は好気性グラニューールの形成も報告され |
| FISH法 | Fluorescence in situ hybridizationの略。蛍光標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行い、顕微鏡下で特定の微生物細胞をそのrRNA遺伝子の配列情報特異的に検出する。 |

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

1.1 NEDO が関与することの意義

本事業では、特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術等を開発することにより微生物群の処理効率を大幅に向上させるなど、処理技術の課題を克服することを目指す。これらの技術を開発し、さらに産業に有効な実用化技術としてゆくには一民間企業や一研究機関が単独で取り組み成果をあげることは資金的、研究ポテンシャル的にも無理がある。このため、民間企業のニーズと開発力を、大学等の基盤研究の蓄積に有機的に連携させ、NEDO の関与のもと、産学官共同事業として研究開発を推進するのが妥当である。

1.2 実施の効果（費用対効果）

本事業での特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術の開発により、処理効率が頭打ち状態にある従来の好氣的産業廃水処理技術や嫌氣的産業廃水・廃棄物処理技術の飛躍的な処理効率向上が期待でき、省エネルギーで余剰汚泥を大幅に削減し、コンパクトでメンテナンスが容易であり、あるいは多様な廃水・廃棄物への適用が可能になる高効率型廃水、廃棄物処理など微生物機能を活用した環境調和型産業システムの創造に資する技術の開発に貢献できる。

2. 事業の背景・目的・位置づけ

「生物機能活用型循環産業システム創造プログラム」は、工業プロセスや環境関連分野へのバイオテクノロジーの利用を促進することにより、生物機能を活用した高度モノ作り社会の構築を図りつつ、廃棄物、汚染物質等の生分解・処理技術の高度化を通じ、環境に調和した循環型産業システムの創造を図るものである。本プロジェクトは上記プログラムの一環として、「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発/微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術」を開発する。

我が国が取り組むべき火急の課題である、環境負荷の低減と省エネルギー化の促進による循環型産業社会の構築には、物質生産プロセス（モノ作り）とその後処理の両面における技術開発が必要である。後処理においては、第3期科学技術基本計画（平成18年3月制定）における重点推進4分野の一つであるライフサイエンス分野において、「生物機能を活用した環境対応技術開発」が重要な研究開発課題として位置付けられる等、生物機能を活用した廃水、廃棄物の処理技術の高効率・高度化が求められている。

従来の産業における廃水・廃棄物処理技術は、①エネルギー多消費・廃棄物多排出、②低処理能力・対象廃棄物限定等といった課題を抱えている。例えば、①については、現行の廃水処理方法において、活性汚泥法が全体の約8割を占めており、その曝気に必要な電力量を石油換算エネルギーとして換算すると日本全体のエネルギー需要量の少なくとも約1.9%を占め、エネルギー消費量が多い。また、現在の廃水処理から発生する余剰汚泥や未利用有機性廃棄物の焼却・埋立処分に係るエネルギー・コストも相当なものになっている。現状のメタン発酵法においても、適用困難なものも含め年間発生する有機性廃棄物の総量約3億トンのうち、適用困難な対象の未利用食品廃棄物は年間約1,760万トンに上っている状況である。②については、産業が多様化する中、多種多様な産業廃水・廃棄物（高濃度廃水や難分解性物質を含む）に適用可能な処理技術の開発が必要とされている。

これまで、このような課題に対し様々な工学的アプローチによる高度化はなされてきたものの、微生物群自体については、依然としてブラックボックスのままであり、自然の摂理の域を出ていなかった。近年になり、我が国の関連研究開発プロジェクトをはじめ国内外において、廃水、廃棄物

の処理における主要な微生物群の分離、同定、機能解明及び主要微生物群のモニタリング技術等の開発が進められ、知見が集積されつつある。

そこで、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO技術開発機構」という。）は特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術（これらの技術を以下、「デザイン化技術」と呼ぶ）等を開発することにより微生物群の処理効率を大幅に向上させるなど、処理技術の課題を克服することを目指して本プロジェクトを実施する。

本プロジェクトでは、我が国の有する知見を活かしつつ、微生物群のデザイン化技術等を開発することにより、省エネルギーで余剰汚泥を大幅に削減し、コンパクトでメンテナンスが容易であり、あるいは多様な廃水・廃棄物への適用が可能になる高効率型廃水、廃棄物処理（主として活性汚泥法・メタン発酵法を対象）の基盤技術を確立し、微生物機能を活用した環境調和型産業システムの創造に資する技術を開発することを目的とする。

Ⅱ. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

最終目標（平成23年度末）

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

特定有用微生物（群）を、人為的に安定導入・維持するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価する技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスでのエネルギー使用量の約2/3の削減を図ること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

特定有用微生物（群）を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価するための技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来のメタン発酵プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、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の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大を可能とすること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

中間目標（平成21年度末）

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

特定有用微生物（群）を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群に人為的に安定導入・維持するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、以上の開発された技術とその機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の成果とを合わせて、約3倍の高効率化の見通しが確実に得られていること。

- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

特定有用微生物群を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群内において人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせ、従来のメタン発酵槽に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現する見通しが得られていることとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大の見通しが確実に得られていること。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を委託により実施した。

平成21年度までは以下により実施した。

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するた

めの技術の開発

下記研究開発テーマ：1)、2)、4)が該当する。

- ② 好気嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

下記研究開発テーマ：3)、及び7)、8)、9)が該当する。

- ③ 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

下記研究開発テーマ：5)、6)が該当する。

- 1) 内生呼吸低減菌等の有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発
- 2) 厨房廃水処理用油脂分解バイオフィームの高機能化・安定化のための微生物製剤導入技術の研究開発
- 3) 高濃度微生物保持DHSリアクターによる溶存メタン・亜酸化窒素温室効果ガスの処理およびリン回収技術の開発
- 4) 有用石油分解菌*Cycloclasticus*のデザイン化に関する研究開発
- 5) デザイン化微生物群を用いた高効率固定床メタン発酵の研究開発
- 6) 嫌気性微生物群のデザイン化による芳香族塩素化合物の嫌気性完全分解技術の開発
- 7) 嫌気性アンモニア酸化(ANAMMOX)プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発
- 8) バイオフィーム工学による微生物のデザイン化の研究開発
- 9) システム論的アプローチによる微生物コミュニティデザインの研究開発

平成22年度以降は以下により実施した。

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物(群)を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

下記研究開発テーマ：1)、2)及び3)が該当する。

- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

下記研究開発テーマ：4)及び5)が該当する。

- 1) 有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発
- 2) 高濃度微生物保持DHSリアクターによるリン回収技術の開発
- 3) バイオフィーム工学による微生物のデザイン化の研究開発
- 4) 嫌気性アンモニア酸化(ANAMMOX)プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発
- 5) デザイン化微生物群を用いた高効率固定床メタン発酵の研究開発

2.2 研究開発の実施体制

本事業は、(委託先が平成21年度までは9機関、この他に大学等と共同研究または再委託研究)平成22年度からは5機関、この他に中央大学、東京大学との共同研究または再委託研究で実施した(別添実施体制図ご参照)。

2.3 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施した。具体的には、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じてプロジェクトの進捗について報告を受けることを行った。

3. 情勢変化への対応

国内外の関連の学会などに参加、研究発表と情報収集を行うなどして、最新の研究動向の把握に務めると同時に、社会情勢・市場動向ならびに法規制等の外部要因の変化に応じて、逐次研究開発計画を見直した。

4. 中間評価結果への対応

平成21年度に中間評価を行い、結果は概ね良好であった。
平成22年度より実施体制の変更を行った。

4. 中間評価結果への対応

4.1 日立プラントテクノロジー

中間評価時のコメント

- 1) 微生物デザイン化により曝気量 1/3 にすること
- 2) 包括固定をすることにより、基質供給律速等が生じて内生呼吸が益してしまうことは生じないか
- 3) エネルギー消費量 2/3 を目標とする場合、どの技術の組み合わせにより、2/3 が達成できるか、組み合わせ例を示すこと。CO₂削減量、汚泥排出量削減・処分まで想定しての試算

1) 本研究開発では、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスでのエネルギー使用量の約 2/3 の削減を目標としている。そうした中、当初、日立プラントテクノロジーでは内生呼吸低減菌を探索し、それらをゲル担体内へ包括固定化することにより、活性汚泥による BOD 酸化で課題となっている内生呼吸を、約 1/3 に低減することを目標に研究を行ってまいりました。しかしながら、近年の廃水処理は、BOD 除去に加え窒素除去も主流になりつつあることを踏まえ、内生呼吸低減菌の保持方法の検討に用いた亜硝酸型硝化技術による酸素供給量低減化をアナモックス技術等と合わせた状態でのエネルギー削減を目指した。

2) 内生呼吸に係わらず、微生物の包括固定化により基質供給律速等が生じた場合、処理の効率化が低下することは明確である。しかしながら、微生物は馴養することで担体表面に最適な微生物フローラを自らデザインすることが確認されており、本研究開発では、そこへ更に pH ショックという人為的な影響を更に及ぼすことによって、基質の最適な消費を促した。

3) 各機関の連携を図り、亜硝酸型硝化とアナモックスとメタン発酵を組み合わせたプラントを想定し、検討した。すなわち、メタン発酵部（電中研担当）では容積 50% コンパクト化を目指し、亜硝酸型硝化（日立プラント、北大（地）担当）及びアナモックス（北大（工）担当）による窒素処理部では活性汚泥を用いた廃水処理のエネルギー消費量 2/3 を目指した。尚、本研究開発項目「①好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術開発」では、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスでのエネルギー使用量の約 2/3 の削減、を目標としておりますが、標準活性汚泥法では窒素処理を目的としていないため、ここでは、窒素処理が可能な活性汚泥プロセス全体に対するエネルギー使用量の約 2/3 の削減を目標とした。

4.2 広島大学

中間評価時のコメント 1

DHS リアクターによる研究開発では純粋基質が用いられてきたが、実排水には有機物質、浮遊物質その他多種類の物質が含有する。特に、メタン発酵消化液はメタンのほか高濃度有機物を含有し、DHS リアクターの目詰まりや他の障害をもたらすので、本プロセスの適用の可能な、実排水の性状についても明らかにするべきである。

<回答 1>

本研究は、排水処理水からのリン回収を目的としており、消化液は対象にしていない。当初の予定通り、実排水を使用して実証試験を行った。リン含有排水には UASB-DHS システム通過後の処理水を用いた。有機性排水には酢酸ナトリウムおよびプロピオン酸ナトリウムで調整した人工基質を用いた。なお、初沈汚泥の酸発酵については、室内実験で条件検討を行った。

中間評価時のコメント 2

DHS リアクターの実用化により、溶存メタンの酸化分解・亜酸化窒素の分解除去が可能になり、CO₂ 排出量を大幅に削減できるので、最終目標に温室効果ガス削減効果を追記することが望まれる。

<回答 2>

それぞれについて CO₂ 排出量の算出を行い、以下の削減数値が得られた。(a) DHS リアクターによる溶存メタン酸化分解：密閉型 DHS の導入で CO₂ 排出量 1/6 以下に削減、(b) 亜酸化窒素ガス分解 DHS リアクターの開発：DHS の導入で CO₂ 排出量 1/4～1/9 以下に削減、(c) リン除去・回収 DHS リアクターの開発：密閉型 DHS の導入でリン回収費用 1/3 以下に削減

4.3 北海道大学地球環境科学研究所

| 中間評価時のコメント | | 対応 |
|------------|---|---|
| 1 | <p>研究開発成果について</p> <p>バイオフィルム工学で解決すべき課題の大きさが不明瞭である。取り上げたサブテーマは環境問題ではあるが、規模感や緊急性の説明が少なく、バイオフィルム工学が解決手段としてなぜ優れるのかという仮説提案がなされていないように思う。</p> | <p>掘削除去により積み上げられた汚染土壌(ブラウンフィールド)は平成20年度現在2.8万ヘクタール土地資産価値10.8兆円と見積もられている。その原位置浄化に有効な微生物投入による土壌修復技術のコストを押し上げる主要因が微生物定着性の低さにある。一方、バイオフィルムとは生体高分子に包まれた微生物の付着凝集体を指し、いわゆるシェルターのような役割をもつため、バイレメ従来法で用いられる浮遊・分散細胞に比べて環境耐性が格段に高く、定着性および活性の持続性に優れる。バイオフィルム工学とはこのような特徴を活用する技術全般を指す。中間評価以降では硝化菌についても、バイオフィルム工学の有効性も証明した。</p> |
| 2 | <p>実用化の見通しについて</p> <p>バイオフィルム工学によるデザイン化については、普及の対象とするフィールドの適切なスケールダウンがなされているのかをまず検証すべきと思われる。</p> | <p>微生物群デザイン化技術開発のためには、まだブラックボックスの域を出ていない活性汚泥内における複雑な微生物群相互作用の演繹的理解が不可欠と考えている。すなわち本研究項目では、モデル系を再構築しつつ汎用的に有効な基本技術や指針の開発を目指している。指摘に従い、対象とする細菌群は全て現場から単離されたものを使い、現場環境を出来る限り反映するよう配慮した。</p> |

4.4 北海道大学工学研究院

中間評価時のコメント

1. 部分硝化を組み合わせた脱窒システムについて

将来的には、高速アナモックスリアクターと、亜硝酸生成のための部分硝化装置とを組み合わせたシステムを考えられていると思いますが、組み合わせたシステムとしての、エネルギー削減、容積コンパクト化についてデータ、もしくは試算すること。

対応

部分消化リアクターの亜硝酸生成速度は $1.2 \text{ kg-TN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ 、一方、Anammox プロセスによる窒素除去速度は平均で $20 \text{ kg-TN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ である。もし、部分消化リアクターで流入 NH_4^+ を 100% 亜硝酸に変換した場合、Anammox リアクターへの流入窒素負荷は最大で、 $2.4 \text{ kg-TN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (部分消化リアクターの処理水と原水を同負荷で Anammox リアクターに流入する) となり、Anammox リアクターの高い能力を生かせない。従って、部分消化リアクターと Anammox リアクターの体積比を 8 : 1 もしくは 5 : 1 ぐらいに設定する必要がある。この条件を考慮したリアクター設定とした。

本プロセスの問題は、やはり部分消化速度の高速化であり、これを達成するために、アンモニア酸化細菌の高密度集積化 (リアクタータイプの検討)、効率的なばっ気方法の確立、などを検討した。エネルギー削減の観点からは、酸素曝気に要するコスト・エネルギーが最大で 62%、外部炭素源の供給は 100%、余剰汚泥の発生量も大幅に削減できる。これに、汚泥処理に要するコスト・エネルギーを考慮に入れると、さらなる削減が見込まれる。従って、従来の活性汚泥法に比べて大幅にランニングコストを削減できる新規省エネ型窒素除去プロセスの構築が可能となると考える。しかし、これは試算であり、実際の実験データを取る必要があると考える。

4.5 電力中央研究所

| 番号 | 中間評価時のコメント | 対応 |
|----|--|--|
| 1 | <p>嫌気性細菌によるメタン発酵及び芳香族塩素化合物の嫌気性処理技術は、地球温暖化防止・循環型社会の形成に大きく貢献するものであり、中間目標に向かって鋭意研究開発が進められている。特に、メタン発酵の酸化還元電位制御に着目して試験を行ったことは興味深く、単純化されたテーブルスケールだが再現性のある結果が得られている。また、芳香族塩素化合物の微生物分解の一貫嫌気分解技術開発は処理コスト低減に貢献し意義深い。</p> <p>しかし、<u>デザイン化微生物群担体に通電することにより、酸化還元電位が最適に維持され、メタン発酵の高効率化が得られた研究成果については、加水分解細菌、酸生成細菌及びメタン生成古細菌から構成される原核微生物群集が何故どのような理論で、基質の有機物の物質分解を高速に行うことが可能となるのか明確にして欲しい。</u></p> | <p>担体に通電することによる主な効果は、担体近傍の酸化還元状態を調節し、担体の微生物およびその活性を維持する効果であるという考えを明確にした。</p> |
| 2 | <p>芳香族塩素化合物の微生物分解は、目標とする好気微生物技術と同等の処理速度を達成し、これに基づく概算のF/Sが実施されており、早期の実用化が期待される。</p> <p><u>酸化還元電位によるメタン発酵の高効率化については、固形物濃度が低く、メタン発酵微生物が過度に増えない処理系への適用が期待できるので、先ずはこのプロセスをターゲットに実液の原水を用い、パイロット規模での長期期間試験を行い、実用化のイメージを明らかにしていくことが望まれる。</u></p> <p><u>電荷チャージを前提とする技法は固定床を選択せざるを得ないとすると、実用プロセスの適用範囲に制限</u></p> | <p>当初の対象が固形分の多い未利用廃棄物であるため、濃縮下水汚泥を用い、実用化のイメージを明らかにしていくための実証を実施した。</p> <p>本研究開発の提案において、未利用分食品残渣などの10%をメタン発酵にリプレースすることを仮定している。</p> |

| | | |
|---|--|--|
| | <p><u>が生じるであろうが、将来、リプレイス可能な嫌気処理の対象は具体的に何で、嫌気処理プロセスの何割を占めるのか普及対象について仮説提案して欲しい。</u></p> | |
| 3 | <p>微生物反応のブラックボックスから脱却することが本プロジェクトの狙いなので、メカニズムの解明は特に大切である。得られた知見の理論化・再整理が充実していけば、世界最高水準の技術に育つであろう。</p> <p>芳香族塩素化合物の嫌氣的分解・原位置処理技術は産業界としてリスク管理面の有用性が非常に高い技術であり、技術開発の加速を期待する。</p> <p>各研究課題が掲げている最終目標はかなりハードルの高いものであるが、5年間という余裕ある研究期間が与えられており、基礎的研究を含めて実用化に至るまでの徹底した研究を完成する好機である。しかも、NEDOの研究目的に叶っており、地球環境保全と循環型社会の形成のために大きく貢献できる日本発の技術なので、是非ともプロジェクトリーダーの下に世界初の環境バイオ処理技術を創造して欲しい。</p> | |

5. 評価に関する事項

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成21年度に実施し、事後評価を平成24年度に実施。また、前述のとおり、中間評価結果を踏まえ、プロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを行った。

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

本事業の研究開発は計画どおり順調に進捗し、目標とする事項に対してほぼ達成できた。

① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

[実施体制：株式会社日立プラントテクノロジー（再委託：中央大学）、広島大学大学院工学研究科、北海道大学大学院地球環境科学研究院]

② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

[実施体制：北海道大学大学院工学研究院、電力中央研究所（共同実施：東京大学）]

個々の成果は以下のとおり。

Ⅲ.1.1

有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発

株式会社 日立プラントテクノロジー

| 目標 | 研究開発成果 | 達成度 |
|---|---|----------------|
| 内生呼吸低減菌の探索 (内生呼吸 10%低減) | 内生呼吸低減菌の取得 (内生呼吸最大 40%低減) | 大幅に達成 |
| 内生呼吸の評価手法の検討 | GC-QMS による内生呼吸計測方法を確立 基質の有り無しにおける内生呼吸の比較を可能にした。 | 大幅に達成 |
| 内生呼吸低減菌フローラの固定化 | 取得した内生呼吸低減菌を包括固定化し、pHショック (pH13、1h) に耐えられることを実証。コンタミ系である実排水処理への適用の可能性を見出した。 | 達成 |
| 亜硝酸型硝化の検討 | 合成廃水処理系において、不要な亜硝酸酸化細菌の不活性化条件を確認した。 | 大幅に達成 |
| 亜硝酸型硝化反応の実証運転 (酸素消費量約 25%低減) 安定した硝化率制御 (硝化率 57%) | NO ₃ 生成抑制による亜硝酸型硝化を実排水処理において実証 (酸素消費量約 25%低減) 消化脱水ろ液の亜硝酸型硝化においてアンモニアセンサーを用いたDO制御による硝化率制御を実証 (硝化率 57%) | 大幅に達成 大幅に達成 |
| 担体菌叢解析 | ユニバーサルプライマ等を用いたクローンライブラリを作製。pH ショック前後での担体内菌叢解析を行い、亜硝酸酸化細菌 Nitrospira 属が消失や Nitrosomonas 属の生存を確認。 | 大幅に達成 |
| 亜酸化窒素排出量の解析 (温室効果ガスの抑制) | pH ショックによる亜酸化窒素発生の抑制効果を確認 | 大幅に達成 |

Ⅲ. 1. 2

広島大学

| 目標 | 研究開発成果 | 達成度 |
|---|---|--|
| <p>(a) DHS リアクターによる溶存メタン酸化分解</p> <p>メタン除去率 90%以上を HRT2 時間で達成する [H20, H21]</p> <p>CO₂ 排出量 1/3 以下に削減</p> <p>H22 年度以降中止</p> | <p>嫌気処理排水を模擬した溶存メタン・アンモニア・硫黄・有機物（酢酸）含有人工排水に対して、HRT2 時間、空気供給量 3.88 kg-O₂·m⁻³·day⁻¹において、メタン除去率 90%以上を達成</p> <p>密閉型 DHS の導入で CO₂ 排出量 1/6 以下に削減</p> <p>(理由) リン除去・回収の研究開発を強化するため</p> | <p>達成</p> <p>達成可能</p> |
| <p>(b) 亜酸化窒素ガス分解 DHS リアクターの開発</p> <p>好気条件下での亜酸化窒素の酸化分解の進行の確認 [H20, H21]</p> <p>嫌気条件下でのメタンを炭素源とした亜酸化窒素の還元除去(脱窒)の進行の確認 [H20, H21]</p> <p>CO₂ 排出量 1/3 以下に削減</p> <p>H22 年度以降中止</p> | <p>亜酸化窒素の酸化分解が継続的に進行する事を確認</p> <p>嫌気条件下において、メタン酸化と亜酸化窒素の還元が継続的に進行することを確認</p> <p>温室効果ガス・メタンと亜酸化窒素を分解することで、CO₂ 排出量 1/4～1/9 以下に削減</p> <p>(理由) リン除去・回収の研究開発を強化するため</p> | <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成可能</p> |
| <p>(c) リン除去・回収 DHS リアクターの開発</p> <p>嫌気・好気時間の検討 [H20, H21]</p> <p>人工排水を用いてリン酸を 100 mg-P·L⁻¹ 以上に濃縮 [H20～22]</p> <p>リン除去・回収率 80%以上を達成 [H20～23]</p> <p>実下水を用いてリン酸を 100 mg-P·L⁻¹ 以上に濃縮 [H22, H23]</p> <p>リン回収費用 1/3 以下に削減</p> | <p>最適なサイクルとして嫌気 4 時間、好気 8 時間を決定</p> <p>流入濃度 5 mg-P·L⁻¹ のリン酸を 158 mg-P·L⁻¹ まで濃縮することに成功</p> <p>担体形状とリアクター運転方法を改善することで、リン除去・回収率 60%以上を達成</p> <p>高濃度硫酸イオン含有 (400～600 mg-SO₄²⁻·L⁻¹) かつ希薄なリン濃度 (1.5 mg-P·L⁻¹) の下水に対して、30 mg-P·L⁻¹ 程度のリン濃縮液を得ることに成功</p> <p>密閉型 DHS の導入でリン回収費用 1/3 以下に削減</p> | <p>達成</p> <p>達成</p> <p>80%</p> <p>達成可能</p> <p>達成</p> |

Ⅲ.1.3

バイオフィルム工学による微生物のデザイン化の研究開発

北海道大学大学院地球環境科学研究院

| 目標 | 研究開発成果 | 達成度 |
|--|---|-------|
| 項目 1. バイオフィルム工学による活性汚泥法の効率化・安定化 | アンモニア酸化細菌 <i>Nitrosomonas europaea</i> の活性を 2.5 倍向上させるバイオフィルム形成法および共存細菌の取得に成功し、その機構を分子あるいは遺伝子レベルで解明した。Anammox 細菌については、主要膜タンパク質を同定することに成功し、同細菌の生理学的特性理解に貢献した。 | 達成 |
| バイオフィルム工学による活性汚泥法の効率化・安定化を目指す。具体的には硝化槽の性能の鍵となるアンモニア酸化細菌および Anammox 菌についてその特性をバイオフィルム形成の点から理解し、バイオフィルム形成による安定化を目指す。 | | |
| 項目 2. バイオフィルム工学による環境浄化技術の効率化・安定化 | ナフタレン分解細菌 <i>Pseudomonas stutzeri</i> T102 のバイオフィルムが原油汚染土壌で長期間安定に活性を発現することを実証すると共に、バイオフィルムが高活性細胞を放出し続ける機能を有する現象を初めて明らかにした。 | 達成 |
| 偏在する環境汚染物質として炭化水素類を取り上げ、その分解細菌群の汚染現場への安定的な導入法の技術基盤をバイオフィルム工学の視点から開発する。 | | |
| 項目 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 | アオウキクサよりフェノール分解活性と植物成長促進活性を同時に有する根圏細菌 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> P23 を世界に先駆けて発見した（特許出願済）。また、P23+アオウキクサ（根圏細菌デザイン化植物）が光照射のみで長期間安定にフェノールを分解し続けることおよび浄化後に細菌が回収できることを実証した。 | 大幅に達成 |
| 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および現場への導入法を開発する。 | | |

Ⅲ. 1.4

嫌気性アンモニア酸化 (ANAMMOX) プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発 北海道大学大学院工学研究院

| 目標 | 研究開発成果 | 達成度 |
|--|---|-----|
| プロジェクト全体の目標： 嫌気性アンモニア酸化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。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（12 Kg-TN/m ³ /dav） | | 達成 |
| (1) Anammoxプロセスの最適条件の検討 | (1) 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 |
| (2) 部分硝化プロセスの最適条件の検討 | (2) NH 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。また、好気グラニュール汚泥部分硝化リアクターを構築し、最大部分硝化速度1.25 kgN m ⁻³ day ⁻¹ を達成した。 | 達成 |
| (3) 人工廃水を用いた実証試験（Anammox並列リアクターの開発） | (3) 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15.0 Kg-TN/m ³ /dを達成した。 | 達成 |
| (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。源位置におけるAnammox活性およびN ₂ 、NO生成活性を微小電極で測定した。 | 達成 |
| (5) Anammox細菌のメタゲノム解析 | (5) <i>Ca. B. sinica</i> の完全長に近いゲノム配列の再構築に成功した。プロテオーム解析を行い、新規窒素代謝経路を発見した。 | 達成 |
| (6) 実廃水を用いた実証試験（Anammoxプロセスのみ） | (6) 実廃水をAnammoxプロセスで処理した。窒素除去速度約6.0 kg-TN m ⁻³ day ⁻¹ を達成した。 | 達成 |

Ⅲ.1.5

デザイン化微生物群を用いた高効率固定床メタン発酵の研究開発

電力中央研究所

| 目標 | 研究開発成果 | 達成度 |
|--|--|-------|
| メタン発酵における微生物群担体の電気制御技術 | | |
| メタン発酵において微生物群担体と通電による制御を組み合わせたメタン発酵技術を開発し、生ごみを対象にした既設のメタン処理施設の日平均容積効率の3倍（有機物負荷量：25.5gCOD/L/日）での安定処理および発酵槽設置面積を50%にコンパクト化を実現する。 | 微生物群担体と通電による制御を組み合わせた通電型固定床メタン発酵槽（容積4L）の実証装置を開発した。 | 大幅に達成 |
| | 模擬生ごみを対象に最大有機物負荷量89.3gCOD/L/日（水理学的滞留時間1.5日）での処理を達成した。 | 大幅に達成 |
| | 濃縮下水汚泥を対象に汚泥提供元設備と比較し、有機物負荷量4.5倍（設置面積：約36%にコンパクト化）での処理を達成した。 | 大幅に達成 |

III. 2. 研究開発項目毎の成果

2. 1 有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発

(株式会社日立プラントテクノロジー)

廃水処理技術で最も広範囲に利用され、普及しているのは活性汚泥法をはじめとする生物学的方法である。産業プロセスにおいて廃水処理は環境問題への関心の高まりとともに重要性がますます認識されてきたものの、廃水処理自体は何も産み出さない非生産プロセスであるため、より一層の効率化が求められている。活性汚泥法における最大のオペレーション・コストは曝気のための電気料金であり、いかに少ない曝気量でいかに大量の汚濁成分を除去するかが技術的な課題となってきた。曝気の効率をあげる装置的な工夫は永年行われてきたが、廃水中の汚濁成分を除去する機能を有する微生物の側からの検討はまったくと言ってよいほど行われていない。また、窒素処理においては曝気コストと並び脱窒反応に必要なメタノールコストが重要な課題となっている。

そこで本研究開発では、活性汚泥を構成する微生物フローラに着目した。曝気による酸素供給のかなりの部分は環境汚染物質の分解に使われておらず、生命維持のための内性呼吸や窒素処理において付随的に進行する亜硝酸酸化反応に使用されている。そこでフローラ菌種を人為的に限定し、内生呼吸低減菌やアンモニア酸化細菌群を選択的に廃水処理へ適用させ、不要な細菌群を可能な限り排除することにより、曝気量に対する処理効率向上のための検討を行った。

平成19年度～21年度では、通常の活性汚泥での曝気された酸素の約1/3を消費する内生呼吸を低減させることを目的として、内生呼吸低減菌の探索をし、その内生呼吸低減効果のGC-QMSによる定量方法の開発を行い、得られた有用菌の安定維持方法について検討した。

さらに平成22年度～23年度は、各研究機関の連携を図りメタン発酵部と亜硝酸型硝化とアナモックスからなる窒素処理部をそれぞれ分担し、アンモニア態窒素を含む有機系廃水処理の実証評価を行った。その中で本研究開発は、亜硝酸型硝化に関わる検討を担当し、内生呼吸

低減菌に関わる研究開発から得られた、目的外の微生物を担体から排除する技術を活用した亜硝酸型硝化処理性能を検証した。また、亜硝酸型硝化は、地球温暖化ガスである亜酸化窒素を多く生成させることが懸念されたことから、その発生特性について評価した。

2. 1. 1 内生呼吸低減菌の探索

1) 理論的考察

a) 内生呼吸と菌体量との関係

内生呼吸は、微生物が飢餓状態に陥ったときに顕著に観察され、細胞内に取り込んだ貯蔵物質を自己分解する際の酸素消費を指すとされている。すなわち、生体中の糖、タンパク質やRNAを好氣的に分解する代謝が内生呼吸であり、その結果、菌体量の減少をもたらす。しかし、内生呼吸に関する動力的考察の文献を見出すことが出来ず、内生呼吸の増減と、菌体量および酸素消費量との関係を演繹的に推定することが困難であった。そこで、本プロジェクトでの研究を開始するにあたり、先ず、活性汚泥処理を行なっている曝気槽内での、内生呼吸を記述する式を導いた。

H: 水理学的滞留時間 (h)

$d = 1/H$: 希釈率 (曝気槽流入量/曝気槽内容積: h^{-1})

S_{in} : 流入する廃水中の BOD 濃度 (流入基質濃度: $mmol O_2/L$)

$S_{out} = 0$: 流出する廃水中の BOD 濃度 (処理水基質濃度) はゼロと仮定する

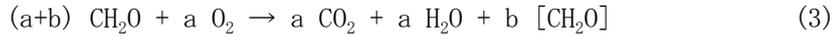
r_1 を呼吸定数 [specific oxygen uptake rate: $mmol$ of oxygen consumed (S) per g dry weight of bacteria (X) per h (t)] とする。また、 S は基質濃度、 K_s は飽和定数とすると:

$$(dS/dt) = r_1 \times X \times S / (S + K_s) \quad (1)$$

$$(dS/dt) = r_1 \times X \text{ when } K_s \ll S \quad (2)$$

通常、 K_s は S に比べて小さいので、以降、(2)式を用いる。

一般に、 a モルの酸素が消費されたとき、 a モルの CH_2O が $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ に変わり、その酸素消費に伴って、菌体量、 $[\text{CH}_2\text{O}]$ 、も b モル増加する。その関係は以下のように表される：



この時、moleの酸素消費あたりの菌体量の増加 (g dry weight)、すなわち、菌体収率 (growth yield coefficient) (Y_1 : g dry weight of bacteria/mol of oxygen) は、菌体組成を $[\text{CH}_2\text{O}]$ で近似すれば：

$$Y_1 = 32 \times b/a \quad (4)$$

曝気槽の菌濃度 (g dry weight of bacteria/L)、 $X(t)$ は：

$$dX(t)/dt = S_{in} \times d \times Y_1 - X(t) \times r_2 \times Y_2 \quad (5)$$

但し、 $X(t) \times r_2 > S_{in} \times d$ for $t > 0$

更に、

r_2 : 内生呼吸定数

Y_2 : 自己分解収率 (“negative growth yield coefficient” or “weight loss coefficient” due to endogenous respiration: g dry weight of bacteria/mol of oxygen)

を定義すれば、内生呼吸による biomass の減少 (endogenous decay constant) は、 $r_2 \times Y_2$ で表すことができる。例えば、内生呼吸によって、貯蔵された炭化水素が消費される場合 $[\text{C}(\text{H}_2\text{O}) + \text{O}_2 = \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}]$ 、1 mol の O_2 で、32 g の減量が起こる、すなわち、 Y_2 は 32 g/mol O_2 となる。

(以上の式では、内生呼吸定数 (r_2) は、外生基質の有無に関わらず一定であるとした。これについては、後で検討する。)

以降、式の展開の見通しを良くするため、

$$S_{in} \times d \times Y_1 = k_f \quad (6)$$

$$r_2 \times Y_2 = k_b \quad (7)$$

と置き換えれば (5) 式は :

$$dX/dt = k_f - (k_b \times X) \quad (8)$$

すなわち、菌体量の増加は 0 次反応であり、減少が一次反応であるという形が見えてくる。一

方、 $L = k_f/k_b$ と置き換えれば

$$L = (S_{in} \times d \times Y_1) / (r_2 \times Y_2) \quad (9)$$

(6) 式は :

$$dX/dt = [(k_f \times L) - (k_f \times X)] / L = (k_f/L) (L - X) \quad (8)$$

$$[1 / (L - X)] dX = (k_f/L) dt \quad (10)$$

(11) 式を積分すると :

$$\int_{X_0}^X \frac{1}{(L - X)} dX = \int_0^t (k_f/L) dt \quad (11)$$

但し、 $t = 0$ の時の菌濃度を X_0 とする。

$$[-\ln(L - X)]_{X_0}^X = [k_b t]_0^t \quad (12)$$

$$\ln[(L - X_0) / (L - X)] = k_b \times t \quad (13)$$

$$(L - X_0) / (L - X) = \exp(k_b \times t) \quad (14)$$

$$L - X = [(L - X_0) / \exp(k_b \times t)] \quad (15)$$

$$X(t) = L - [(L - X_0) / \exp(k_b \times t)] \quad (16)$$

$$X(t) = L \{1 - [1 / \exp(k_b \times t)]\} + [X_0 / \exp(k_b \times t)] \quad (17)$$

$$X(t) = (S_{in} \times d \times Y_1) \{1 - [1 / \exp(r_2 \times Y_2 \times t)]\} / (r_2 \times Y_2) + [X_0 / \exp(r_2 \times Y_2 \times t)] \quad (18)$$

BOD 除去に必要な最小の菌濃度、 X_{\min} (g dry weight/L) は：

$$S_{\text{in}} \times d - [r_1 \times (Y_1/32) \times X_{\min}] = X_{\min} \times r_1 \quad (19)$$

ここで、 $[r_1 \times (Y_1/32) \times X_{\min}]$ は、BOD が菌体量へと変換された量である。

また、 Y_1 を 32 で除しているのは、 Y_1 を g dry weight で表現しているためである[式 (4) 参照]。以下：

$$y_1 = Y_1/32 \quad (20)$$

$$y_2 = Y_2/32 \quad (21)$$

と記す。

$$X_{\min} = (S_{\text{in}} \times d) / [(1 + y_1) \times r_1] \quad (22)$$

$$X_{\min} \times [(1 + y_1) \times r_1] = S_{\text{in}} \times d \quad (23)$$

であるから

$$X(t) = \{X_{\min} \times r_1 \times [y_1 + (y_1)^2]\} \times \{1 - [1 / \exp(r_2 \times y_2 \times t)]\} / (r_2 \times y_2) + [X_0 / \exp(r_2 \times y_2 \times t)] \quad (24)$$

一方、時間当たりの内生呼吸量、 $X(t) \times r_2$ 、は：

$$X(t) \times r_2 = (S_{\text{in}} \times d \times y_1) \{1 - [1 / \exp(r_2 \times y_2 \times t)]\} / Y_2 + [(X_0 \times r_2) / \exp(r_2 \times y_2 \times t)] \quad (25)$$

$$X(t) \times r_2 = \{X_{\min} \times r_1 \times [y_1 + (y_1)^2]\} \times \{1 - [1 / \exp(r_2 \times y_2 \times t)]\} / Y_2 + [(X_0 \times r_2) / \exp(r_2 \times y_2 \times t)] \quad (26)$$

以上が内生呼吸 $X(t) \times r_2$ 、あるいは菌体量 $X(t)$ を記述する式である。この式を用いた曝気槽内での菌の増殖のシミュレーションについては後述する。

この式を参照しながら、内生呼吸を減少させるに必要なパラメーターの変化を以下に考察する。

▶曝気槽内の $X(t)$ を小さくすれば、当然、内生呼吸は小さくなる。しかし、 $X(t)$ を減

らしすぎると、処理の不安定化を招くので、BOD 除去に必要な最小の菌濃度、 X_{\min} 、の数倍

の $X(t)$ を曝気槽内に保ち運転されている。曝気槽内の $X(t)$ を小さくするためには、以下のパラメーター変化が有効である。

✓ 式 (21) より、 r_1 が大きければ、小さな $X(t)$ で処理できる。

✓ 式 (5) より、 Y_1 が小さければ、 $X(t)$ の増加が抑えられる。

▶ 一方、内生呼吸定数 r_2 を小さくすれば、内生呼吸は小さい。

b) 酸素の有効利用効率

曝気槽中で、酸素は、BOD の除去（分解と菌体への変化）と、内生呼吸とに使われる。前者は式 (23)、すなわち、 $X_{\min} \times [(1 + y_1) \times r_1]$ で与えられ、ここでの酸素は、BOD 除去に有効である。一方、内生呼吸、すなわち、 $X(t) \times r_2$ は、BOD 除去の観点で浪費である。そこで、酸素の有効利用効率 (R) を、

$$R = X_{\min} \times [(1 + y_1) \times r_1] / [(X_{\min} \times r_1) + (X(t) \times r_2)] \quad (27)$$

と定義する。この値は、時間の関数であり、時々刻々変化するが、ある時点での $X(t)$ と X_{\min} の比、すなわち、廃水処理に最小限必要なバイオマスの何倍のバイオマスが存在するかを f で表せば；

$$f = X(t) / X_{\min} \quad (28)$$

$$R = [(1 + y_1) \times r_1] / [r_1 + f \times r_2] \quad (29)$$

大腸菌においては、

$$y_1 = 0.3 \text{ (Noda et al., 2006)}$$

$$r_2 = 0.35 \text{ (本研究：後述)}$$

$$r_1 = 10 \text{ (本研究：後述)}$$

であるので、この値を式 (29) を代入すると、

$$R = 13 / (10 + 0.35f) \quad (29)$$

通常の運転では、BOD 酸化に使われる酸素消費量と、内生呼吸に使われる酸素消費量とはほぼ等しい。このことから、 f は 50 付近と推定できる。 $f = 50$ の場合の R は：

$$R = 0.47$$

もし、 r_2 を 40% 減少させることが出来れば (後述)、 R は：

$$R = 0.69$$

すなわち、酸素利用効率は約 50% 上昇することになる。

2) 大腸菌内生呼吸の生理学

以上の考察が妥当であるか否かを調べるため、大腸菌において、内生呼吸が低減した突然変異体を分離し、酸素利用効率が、内生呼吸低減によってどのように変化するかを調べることにした。

基質が無い時の呼吸、すなわち、内生呼吸は、1960 年代に大腸菌を用いて研究されたが、それ以降、これと言った進歩は無い。大腸菌の場合でも、基質が無くなると、貯蔵物質の分解による内生呼吸が起こるが、その主な基質はグリコーゲンであるという (Dawes and Ribbons, 1965)。基質が無くなった時にタンパク質は分解されるが、合成も起こり、タンパク質の総量はほぼ一定である。また、脂質の分解はほとんど起こらない。結局、内生呼吸では、まずグリコーゲンが使われ、次に RNA 特にそのリボース部分が使われる。もしそうであるならば、グリコーゲンあるいは RNA の分解が欠損した突然変異体では、内生呼吸は低くなっている、すなわち、前式

の r_2 が小さくなっていると思われる。

3) 大腸菌におけるグリコーゲンの合成と分解

図1にグリコーゲンの構造を示す。

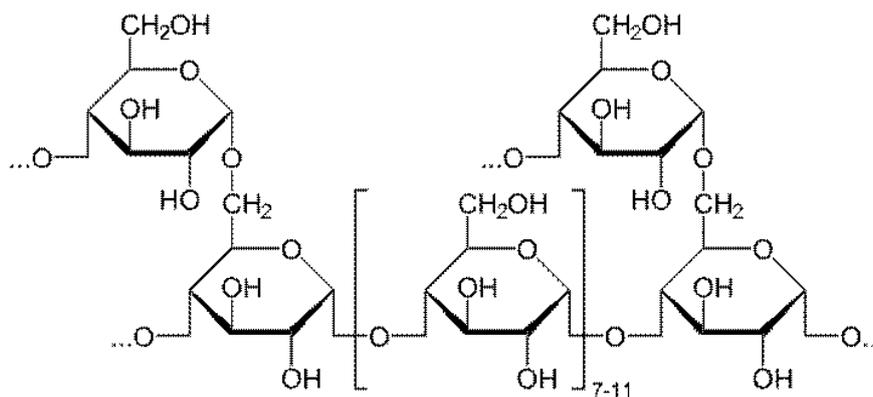


図1 グリコーゲンの構造

グリコーゲンの合成経路は、以下の三つの酵素よりなる。



ADP-glucose pyrophosphorylase (GlgC; EC 2.7.7.27)



Glycogen synthase (GlgA; EC 2.4.1.21)



Amylo-(1,4-1,6)-transglycosylase (GlgB; EC 2.4.1.18)

一方、グリコーゲンの分解に関与する酵素も知られている (図2)。

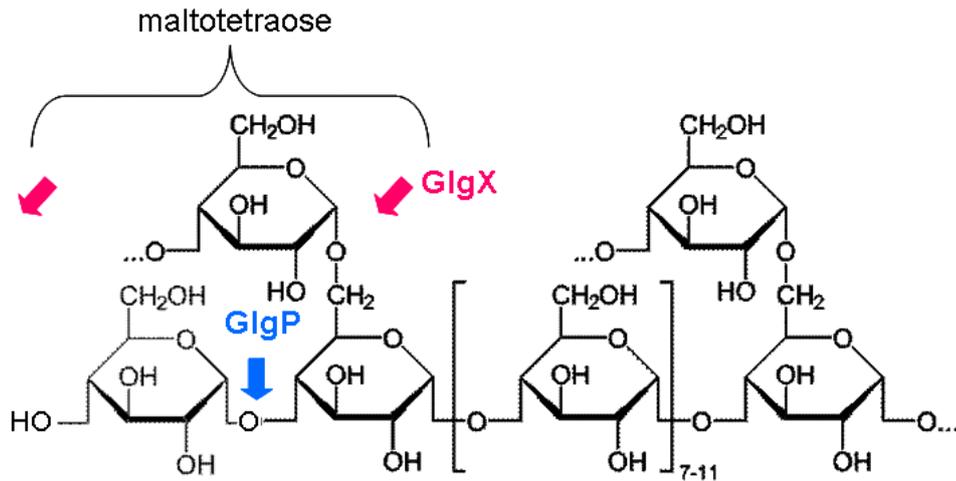
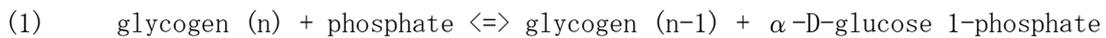


図2 グリコーゲン分解に関する酵素の作用箇所

分解の反応は以下の通りである (Dauvillée, D. *et al.*, 2005; Alonso-Casajús, *et al.* 2006)。



Glycogen phosphorylase (GlgP; EC 2.4.1.1)



Amylo- α -1,6-glucosidase (GlgX; EC 3.2.1.33)

すなわち、*glgX* および *glgP* 変異を持つ突然変異体は、グリコーゲンの分解に欠損がある故、内生呼吸が減少している可能性がある。これを実際に調べてみた。

4) 大腸菌の内生呼吸の測定

野生型の大腸菌 (Wt)、および幾つかの突然変異体の内生呼吸の測定を行った。用いた突然変異体は、(1) グリコーゲンの合成あるいは分解に欠損があるもの、(2) 複数ある RNA 分解酵素のいずれかに突然変異を持つもの、(3) あるいは ATP 合成に欠損があるものを用いた。用いた突然変異体を表 1 に示してある。

| Strain names | Alternative strain designation | Description (genotypes) |
|--------------|--------------------------------|---|
| ME9062 | BW25113 | rrnB3 Δ lacZ4787 hsdR514 Δ (araBAD)567 Δ (rhaBAD)568 rph-1 |
| JW1279 | BW25113 <i>rnb</i> | defective in RNase II |
| JW0603 | BW25113 <i>rna</i> | defective in RNase I |
| JW2263 | BW25113 <i>elaC</i> | defective in RNase BN |
| JW3216 | BW25113 <i>rng</i> | defective in RNase G |
| JW5851 | BW25113 <i>pnp</i> | defective in polynucleotide phosphorylase (PNPase) |
| JW3391 | BW25113 <i>glgP</i> | defective in glycogen phosphorylase |
| JW3394 | BW25113 <i>glgX</i> | defective in amylo- α -1,6-glucosidase |
| JW3393 | BW25113 <i>glgC</i> | defective in ADP-glucose pyrophosphorylase |
| JW3475 | BW25113 <i>yhiF</i> | defective in transcriptional regulator yhiF |
| JW3392 | BW25113 <i>glgA</i> | defective in glycogen synthase |
| JW3395 | BW25113 <i>glgB</i> | defective in amylo-(1,4-1,6)-transglycosylase |
| JW3712 | BW25113 <i>atpA</i> | defective in F1-ATPase |
| CGSC7629 | DH5alpha/pCP20 | carry plasmid pCP20 |

表 1 使用した大腸菌株

まず、大腸菌それぞれの株を LB 培地中、30°Cで一晩（10 時間）培養し、LB 中での呼吸速度を、酸素電極を用いて測定した。また、乾重量は、きまった吸光度の細菌浮遊液を遠心し、集めた菌体を 110°Cで1時間乾燥させ、乾重量を測定した。野生型の LB 中の呼吸速度は、約 10: mmol oxygen per g dry weight per h であり、この呼吸速度は、JW3712 株 (*atpA* 突然変異体) を除く突然変異体の、LB 中での呼吸速度とほぼ同じであった。

次に、これらの菌をリン酸バッファーにけん濁した時の内生呼吸を測定した。4°Cで 5,000 rpm、5 分間遠心し、沈殿した細胞を、100 mM リン酸バッファー (pH 7.4) にけん濁した。再度、4°Cで 5,000 rpm、5 分間遠心し、同じバッファーにけん濁した。この細菌浮遊液を、30°Cで、振とうしながら、一定時間保った。遠心終了後決まった時間後に、酸素電極を用い、30°Cで、細菌の呼吸速度を測定した。図 3 にその結果の一部を示す。

この図から明らかなように、リン酸バッファーにけん濁された直後 30 分は、呼吸速度が急速に減少する必要があるが、それ以降は、呼吸速度は、徐々にしか減少しなくなる。遠心直後では、代謝され易い代謝中間体が菌体内に残っている可能性があるが、それが消費されたあとは、貯蔵物質が徐々に消費されるのであろう。野生型の内生呼吸速度は、LB 中の呼吸速度の 3-4%であった。予想通り、グリコーゲン分解が欠損した突然変異体の呼吸速度は、野生型より 3-4 割低かった。一方、RNase が欠損した突然変異体については、内生呼吸が野生型より低くはならなかった。

これらの実験のまとめを表 2 に示した。

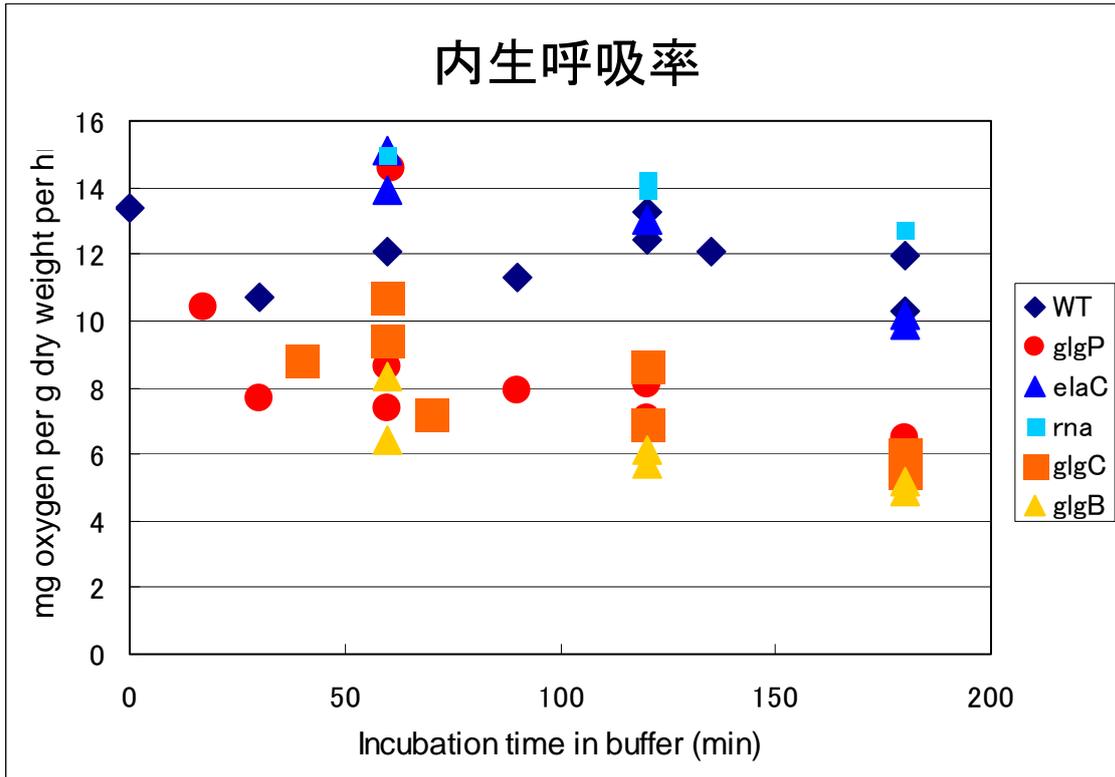


図3 大腸菌の内生呼吸 (WT: 野生型、突然変異体については、表1を参照)

| | | Endogenous respiration (mg oxygen per g dry weight per h) | | |
|-------------|----------------------|--|--------------------|---------|
| Strain | Defect | Mean | Standard Deviation | % to WT |
| WT | | 11.9 | 1 | 100 |
| <i>glgA</i> | Glycogen synthesis | 7.3 | 0.8 | 61.3 |
| <i>glgC</i> | | 8.6 | 1.6 | 72.1 |
| <i>glgB</i> | | 6.3 | 1.2 | 53.2 |
| <i>glgX</i> | Glycogen degradation | 7.4 | 4 | 62.4 |
| <i>glgP</i> | | 9.8 | 2.9 | 82.6 |
| <i>elaC</i> | RNA degradation | 13 | 1.9 | 108.9 |
| <i>pnp</i> | | 11.8 | 3.1 | 99.3 |
| <i>rna</i> | | 14.2 | 1 | 118.8 |

表2 大腸菌突然変異体の内生呼吸

グリコーゲンの合成および分解いずれかに欠損がある突然変異体は、いずれも野生型より低い内生呼吸活性を示し、突然変異の違いで有意の差があるとは認めがたかった。そこで、以降の実験では、*glgA* に変異を持つ突然変異体を用いることとし、その突然変異体に、RNA 分解の変異を加えることによって、内生呼吸が更に減少するかを調べた。

多重突然変異体の作成は、以下のようにして行った。今回使用した大腸菌突然変異体は、それぞれの遺伝子配列のほとんどを除去し、その代わりにカナマイシン抵抗性遺伝子（カナマイシン抵抗性カセット）を組み込んだものである（図 4）。このカナマイシン抵抗性カセットには、FRT (Flipase Recognition Target) という配列が、カナマイシンを挟む形で存在している。例えば、*glgA* の突然変異体には、*glgA* 配列に代わり、FRT-(Km^r)-FRT という配列が組み込まれている。左右の FRT 配列同士は、FLP リコンビナーゼ (Flipase recombination enzyme) が存在すると、部位特異的な組換えを起こす。すなわち、FLP リコンビナーゼを保持するプラスミド pCP20 をカナマイシン抵抗性カセットを持つ株に導入すると、FRT-(Km^r)-FRT の部分で組換えを起こし、1 コピーの FRT のみを保有する株が作成される。pCP20 プラスミドの増殖は温度感受性である。よって、カナマイシン抵抗性カセットを持つ株のコンピテンツセルを作成した後、pCP20 をコンピテンツセルに導入し、ヒートショックを加えることなしに、30°C で培養し、pCP20 のマーカーであるアンピシリン耐性で、形質転換体を選択した。この形質転換体を 30°C でコロニーを作らせ、さらに、そのコロニーから、シングル・コロニー・アイソレーションによって、複数のコロニーを作らせた。このようにして得られたコロニーは、もはやカナマイシンに対して抵抗性を示さなくなっていた。これは、pCP20 より発現した FLP リコンビナーゼによって、Km^r 遺伝子が切り出されたためである。このようにして得られたカナマイシン感受性 (Km^s) の細胞を、今度は 42°C で育てた。pCP20 は、温度感受性プラスミドであるので、この温度で増殖せず、細胞より脱落した。このようなプロセスを通して、Km^r の *glgA* 突然変異体を、Km^s の *glgA* 突然変異体に変えることが出来た（図 4）。

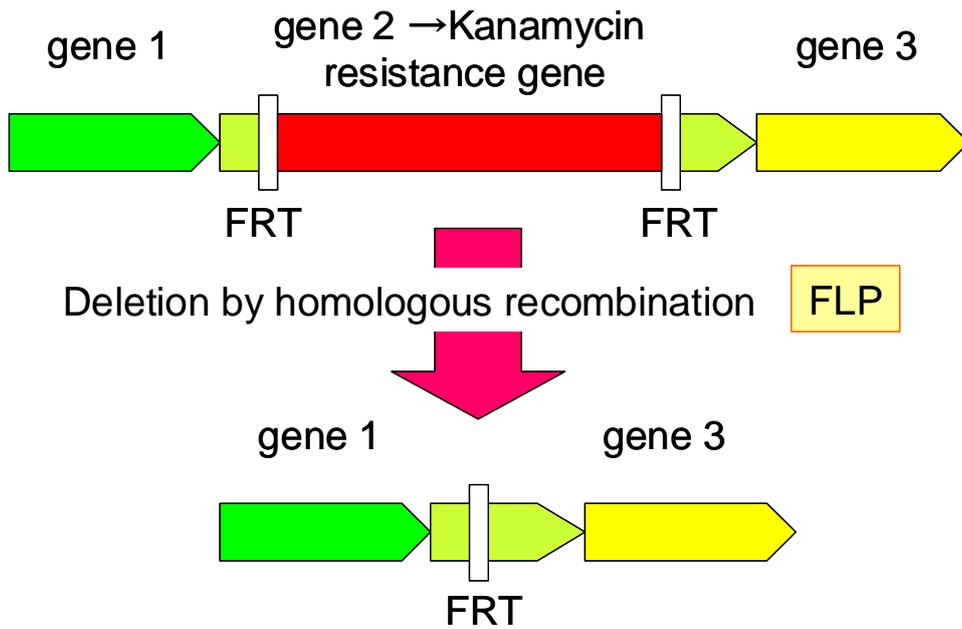


図 4 FLP リコンビナーゼを用いたカナマイシン耐性遺伝子の除去

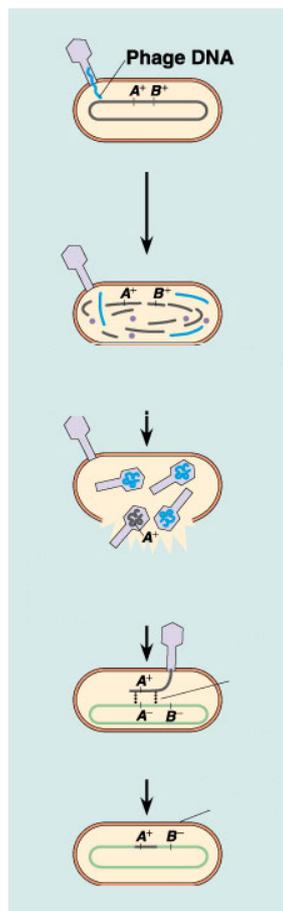


図 5 P1 ファージを用いた形質導入 (transduction)

次に、カナマイシンに感受性になった *glgA* 突然変異体に、RNase 欠損突然変異（例えば *rnb::Km^r*）を、カナマイシン耐性をマーカーを指標にして導入し、*glgA* と RNase 突然変異（例えば *rnb*）の二重突然変異体を作成した。これは *rnb::Km^r* の導入として例示した以下の手順に従った。

まず、P1 ファージを、*rnb::Km^r* 突然変異を持つ突然変異体に感染させ、ファージライセートを調製した。次いで、カナマイシンに感受性になった *glgA* 突然変異体に、そのファージ・ライセートを持ちいて P1 ファージを感染させ、カナマイシン耐性の形質導入を行った。得られたカナマイシン耐性株は、*rnb::Km^r* を獲得し、RNase I が欠損する。

同様な方法で、*glgA* が欠損し、同時に RNase が欠損している株を作成した（図 6）。これらの株について、内生呼吸を測定した。内生呼吸量については、実験ごとの差が比較的大きかった。そこで、毎回の実験において、野生型と突然変異体とを培養し、野生型と突然変異体との内生呼吸の比を測定することにした。測定は、リン酸 buffer 中にけん濁させた大腸菌を、2 および 3 時間、30°C でインキュベーションした後測定した。野生株に対しては、50 回以上独立な測定を実施した。また、ほとんどの突然変異株に対しては 5-20 回の測定を実施した。（*glgA elaC rna* および *rna* 株については 2 回のみ。）結果を図 6 に示してある。

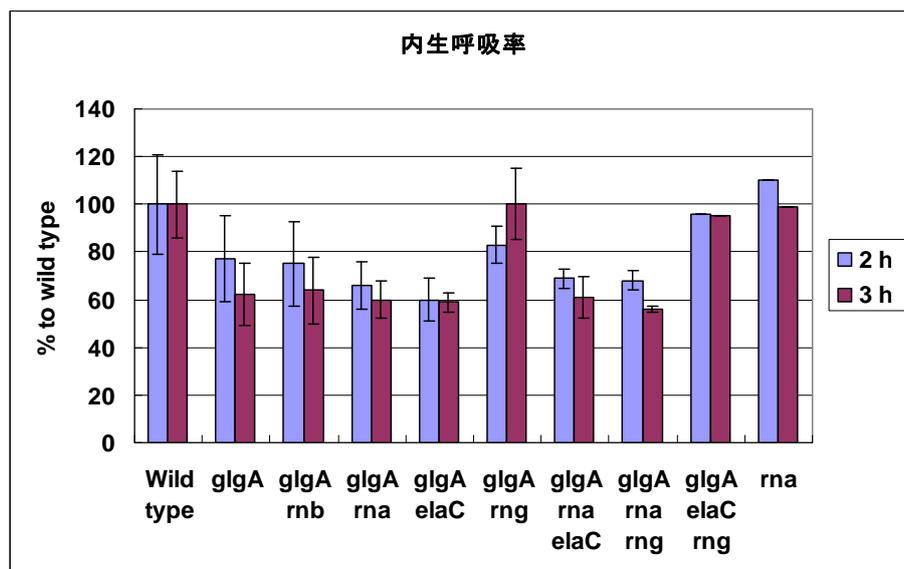


図 6 *glgA* と RNase 欠損の多重突然変異の内生呼吸

これらの実験から、実験ごとの活性のばらつきが大きいにも関わらず、*glgA* および *glgA elaC* 等に二重・三重突然変異体では、内生呼吸が野生型に比べて優位に低く、平均して 40%あるいはそれ以上の減少率であることがわかった。このようにして、目的としていた内生呼吸低減株を得ることが出来た。現在、これらの株を用い、酸素消費効率を測定中である。

5) ATPase 欠損突然変異の増殖特性

式(5)の右辺は、二つの項に分かれる。

$$dX(t)/dt = (S_{in} \times d \times Y_1) - (X(t) \times r_2 \times Y_2) \quad (5)$$

すなわち、 $(S_{in} \times d \times Y_1)$ は、BOD 消費によって、増殖する部分を示し、 $(X(t) \times r_2 \times Y_2)$ は内生呼吸によって、減少する部分を示す。 $X(t)$ が増加すれば、内生呼吸も増加するので、内生呼吸減少という観点からは、 $X(t)$ の増加が少ない方が良い。そして、増加に関わる項は、 Y_1 に比例する。すなわち、菌体収率が低ければ、 $X(t)$ の増加が抑えられる。

一方、曝気槽内の菌体量は、BOD 除去に必要な最小の菌濃度、 X_{min} の数十倍に保たれ、安定的な運転を保証している。もし、 X_{min} の値が小さければ、安定的に運転するのに必要な菌体量も小さくなり、その結果、内生呼吸量も小さくなる。式(22)から、呼吸定数 r_1 、あるいは菌体収率 (Y_1 あるいは y_1) が大きければ、 X_{min} が小さくなることが判る。

$$X_{min} = (S_{in} \times d) / [(1 + y_1) \times r_1] \quad (22)$$

Y_1 が小さく、かつ r_1 が大きい大腸菌の突然変異体が知られている。それは ATPase が欠損した突然変異体 (*atpA*) である (Noda et al., 2006)。実際に、*atpA* 突然変異体を用い、LB 中での呼吸と、増殖後の最終到達菌濃度を測ってみると、 Y_1 が小さく、かつ r_1 が大きいことが示唆された (表 3)。

| | WT | <i>atpA</i> | Ratio |
|---|-------|-------------|-------|
| Respiration rate (r_1 : mmol oxygen per g dry weight per h) | 10.9 | 18.3 | 1.68 |
| Maximum growth yield in LB (Y_1 : g dry weight/L) | 0.837 | 0.439 | 0.52 |

表3 *atpA* 突然変異体の LB 中の呼吸速度と増殖到達度

先ず、*atpA* 突然変異体の呼吸速度 r_1 は野生型のその約 1.7 倍であるので、曝気槽内の菌体量が $1/1.7$ 倍での運転が可能であり、内生呼吸も $1/1.7$ 倍に減少させることができる。図4に、式(25)を用いた、曝気槽内での *atpA* 突然変異体の増殖のシミュレーション結果を示す。

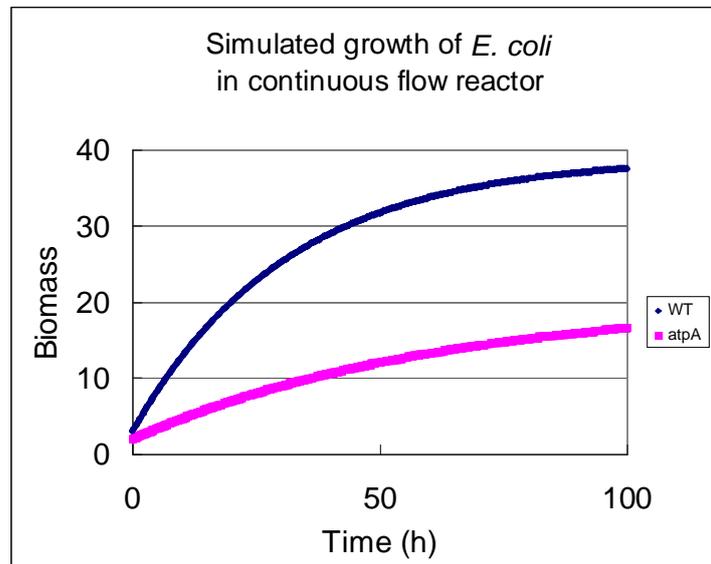


図7 野生型および *atpA* 突然変異体の曝気槽内での増殖のシミュレーション

図7から明らかなように、*atpA* 突然変異体の増殖は、野生型に比べ遅い。このことから、この突然変異体を用いれば、野生型に比べより少ない余剰汚泥を生じるし、余剰汚泥を引き抜く間では、常に野生型より少ない菌体量での処理が可能であることを示している。

atpA 突然変異体の問題点として、コハク酸等の有機酸 (C4-dicarboxylates) の能動輸送が欠損していることが上げられる。すなわち、この株は、有機酸の処理に適していない。これは、

大腸菌の持つ、遺伝子発現調節機構によって、*atpA* 突然変異体の中で、能動輸送系タンパク質の発現が抑えられているためである。しかし、*yhiF* という遺伝子の突然変異体では、この発現調節が解除され、C4-dicarboxylates の能動輸送が回復することが報告されている (Boogerd et al. 1998)。よって、*atpA*, *yhi* 二重突然変異体を作成し、その内生呼吸を測定した。また、その株に *glgA* 突然変異を導入し、内生呼吸を測定した。結果を図 8 に示す。

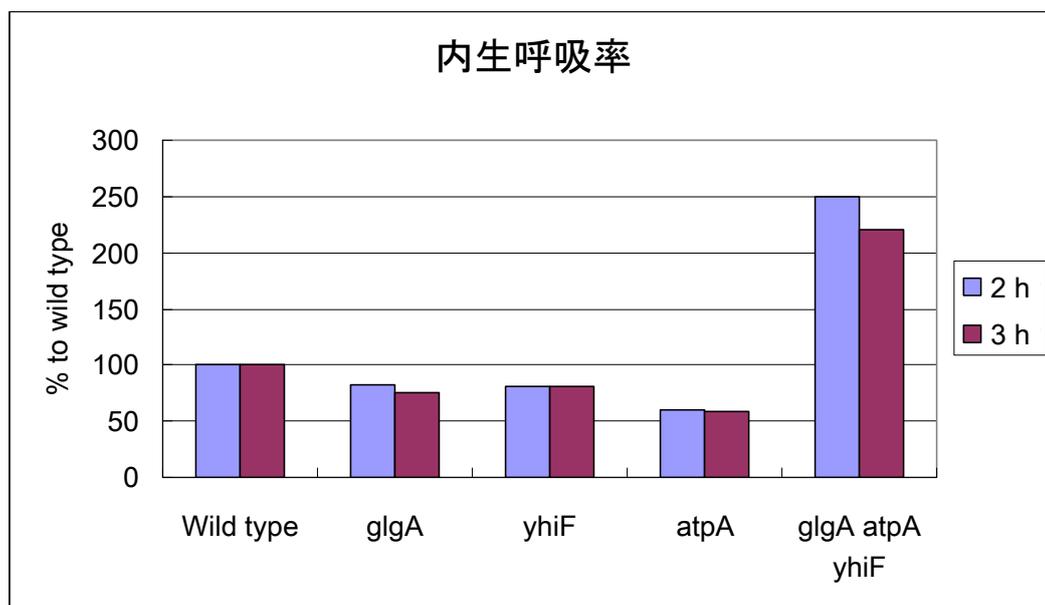


図 8 *atpA*, *yhiF* および *glgA* 変異の内生呼吸に対する影響

atpA 突然変異体の内生呼吸は、野生株の半分近くであった。また、*yhiF* の内生呼吸も野生型よりは低かった。しかしながら、*atpA yhiF* 二重突然変異体 (データ省略) および、*atpA yhiF glgA* 突然変異体の内生呼吸率は、野生型の約 2 倍であった。この高い内生呼吸率は、*atpA* 欠損株の細胞が“スリム”であることに起因している。やせているにも関わらず、野生型と同じ呼吸を行うので、乾重量換算での呼吸率を測定すると、野生型よりも高くなるのである。実際、内生呼吸率 (r_2) のみならず、基質存在化での呼吸率 (r_1) も約 2 倍に上昇している。では、何故 *atpA* のみの突然変異を持つ株では内生呼吸率は低かったのでしょうか? *atpA* 株で内生呼吸が低か

ったのは、恐らく TCA 回路の基質を効率良く利用できないからと思われる。*atpA* 株に、さらに *yhiF* 突然変異を導入すると、TCA 回路の基質が利用できるようになり、内生呼吸が上昇したと思われる。

以上の結果から、*atpA* 突然変異を持つ株が、内生呼吸低減という観点で、野生型よりも優れている性質を見出せなかった。この結果を受けて、以後、*atpA* 突然変異体を用いた解析は、終了することとした。

2. 1. 2 GC-QMSによる内生呼吸低減効果の定量方法の開発

気体定量用ガスクロマトグラフ・四重極型質量分析計(GC-QMS)による微生物が発生する気体状代謝産物の定量方法の確立を目的に検討した。

曝気効率の高い内生呼吸低減菌の微生物を選抜するために、安定同位体である ^{13}C で標識した酢酸塩やグルコースを微生物の餌として、それが炭酸ガス ($^{13}\text{CO}_2$) に回る分とからだ (^{13}C -biomass) に回る部分を測定すること、また、予め ^{13}C を取り込ませていた菌体を用いて、 $^{13}\text{CO}_2$ 発生を測定することにより、いったん貯蔵物質に返還された餌（水質汚濁物質）が酸素の‘無駄遣い’のために消費されるかを測定できることが好ましい。安定同位体 ^{13}C で標識された炭酸ガス ($^{13}\text{CO}_2$) を検出・定量するための装置として気体定量用 GC-QMS を使用できるかを検討した。

1) 研究上 GC-QMS に求められる性能

四重極型質量分析計 (GC-QMS, Gas Chromatograph Quadrupole Mass Spectrometry) の近年の主な用途は未知な有機物の同定あるいは構造決定である。より大きな分子量を持つ物質の分析への需要が多い。この目的では、分析中の大気の混入はまったくの妨害であるため、気体分子相当の小さな分子量、例えば分子量 100 以下、は分析から除外する。ところが、本研究では炭酸ガスなど、微生物が発生する気体状代謝産物の定量が目的であり、分析対象は概ね分子量

25~50 である。したがって、GC-QMS に求められる性能は以下のように特異である。本年度は以下の条件を可能にする設定を GC-QMS に施した。

a) 分子量 50 以下で質量分析計 (QMS) をチューニングする。

四重極型の質量分析計製品は主に高分子量の有機物分析用に設計されている。本実験では極めて低分子量な窒素ガスの分析を行うため、分子量 50 以下の分子量をもつ気体分子を定量することを目的に、真空ポンプで除かれずに質量分析管内に残存した大気成分を用いて、質量分析計をチューニングできることを確認する。

b) 分子量差 1 の分子ピークが重ならないこと。

本研究での主要な検討対象である 2 種類の分子 ($^{12}\text{CO}_2$, $^{13}\text{CO}_2$) の分子量の差は 1 であるが、それぞれを定量するためには、重なり合うことなく分離できることが絶対条件である。そのためには質量分析における質量半値幅を <0.3 にすることが必要で、しかもその条件でチューニングできることを実証する。

c) 分析時に起こる大気の逆流 (吸い込み) を防止できていることを確認する。

d) キャピラリー・カラムで CO_2 をピークとして分離して 0.1 nmol オーダーの $^{13}\text{CO}_2$ を定量することが必要であるが、これを可能であることを確認する。

2) GC-QMS のチューニング

前述の条件でチューニングを行い、2) で述べた条件を達成できることを確認した。チューニングには真空ポンプで除かれずに質量分析管内に残存した大気成分を利用し、分子量 < 50 に対応したチューニングを行うことができ、さらに質量分析における質量半値幅を 0.3 に設定することで分子量差 1 の天然の安定同位体を検出・分離することが可能であった。すなわち、窒素については天然で最も多い $^{28}\text{N}_2$ およびその次に多い $^{29}\text{N}_2$ (天然の存在比 ; 0.736%) を重なり合うことなく分離でき、さらには検量線を用いて定量できることが示された。また、酸素についても $^{32}\text{O}_2$ のほかに $^{34}\text{O}_2$ (天然の存在比 ; 0.410%) を分離かつ検出できた。

図9にさまざまな量の大气をGC-QMSで分析したときの $^{32}\text{O}_2$ と $^{34}\text{O}_2$ のピークエリア値を示した。 $^{32}\text{O}_2$ と $^{34}\text{O}_2$ のいずれの場合もインジェクション量とピークエリアには直線関係が得られた。しかし、この分析条件では0インジェクション外挿点のピークエリアが正の値となり、原点を通らなかったことから、分析の際に大气が混入した可能性が高いことが示された。

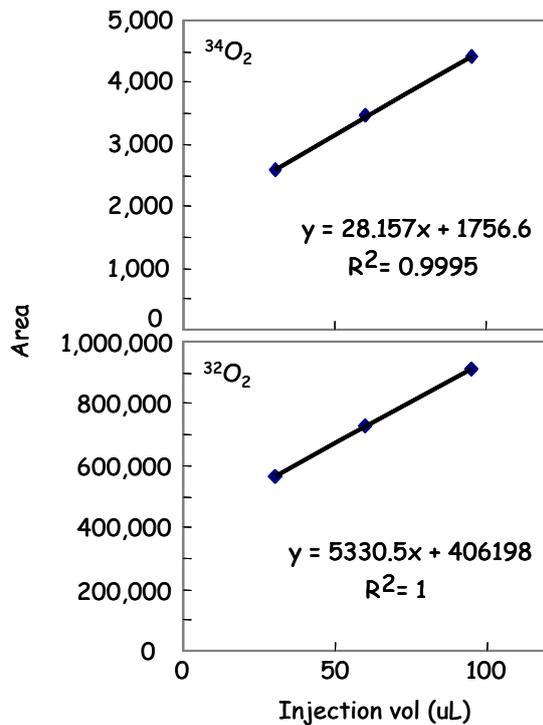


図9 大气 25-100 $\mu\ell$ をGC-QMSで分析したときの $^{32}\text{O}_2$ (下図)および $^{34}\text{O}_2$ (上図)のピークエリア積分値。

3) 炭酸ガス定量方法の確立

気体の定量方法の確立として、亜酸化窒素 N_2O を対象として検量線の作成を試み、上記3)で述べた分析時の大气の吸い込みがないこと、および4)で述べた感度が得られるか、また分析の精度とダイナミック・レンジについても検討した。大气の吸い込みの問題は、分析ガス流路の逆流を防止するためのハード的な対策を講ずることにより分析にまったく支障がないレベルに抑えることができた。

ところで、本研究では炭酸ガス (CO_2) が分析の主要な対象であるが、大气中にある程度の量として存在するために (CO_2 発生源から離れた場所で約 300 ppm、都市部で 450 ppm レベル)、GC-QMSの性能としての感度や精度を検討する目的には適していない。そのため、分子量が同じで、2種

類の原子から成り立つ点でも共通する亜酸化窒素 N_2O を対象として検量線の作成を試みた。この実験で使用した分離条件で CO_2 と N_2O とは GC によって明確に分離できるものの、それらのリテンションタイムは非常に近い (図 10)。また、大気中での分圧がいくら小さいとはいえ、微生物反応によって N_2O が大量に生成する場合があるため、 CO_2 を定量する場合には N_2O も必ず分析しておき、定量対象とするピークが N_2O でないこと、および大量の N_2O が CO_2 の定量を妨害していないことを確認しておく必要がある。

その結果、0.5 nmol の N_2O を十分検出することができ、少なくとも 0.5 - 10 nmol にわたる広い範囲で試料の導入量と分析ピーク面積の間に直線関係が成り立っていることを確認し、定量目的に利用できる検量線を得ることができた。検量線の重相関係数は 0.976 と高かった (図 10)。そのデビエーションの主な原因は試料の導入の正確さにあると考えられ、GC-QMS による分析自体は極めて高い精度があると考えられた。

調整した GC-QMS で CO_2 を分析したところ、独立に分離したクロマト・ピークを与えることが確認され、適切に分析・定量できると考えられた。

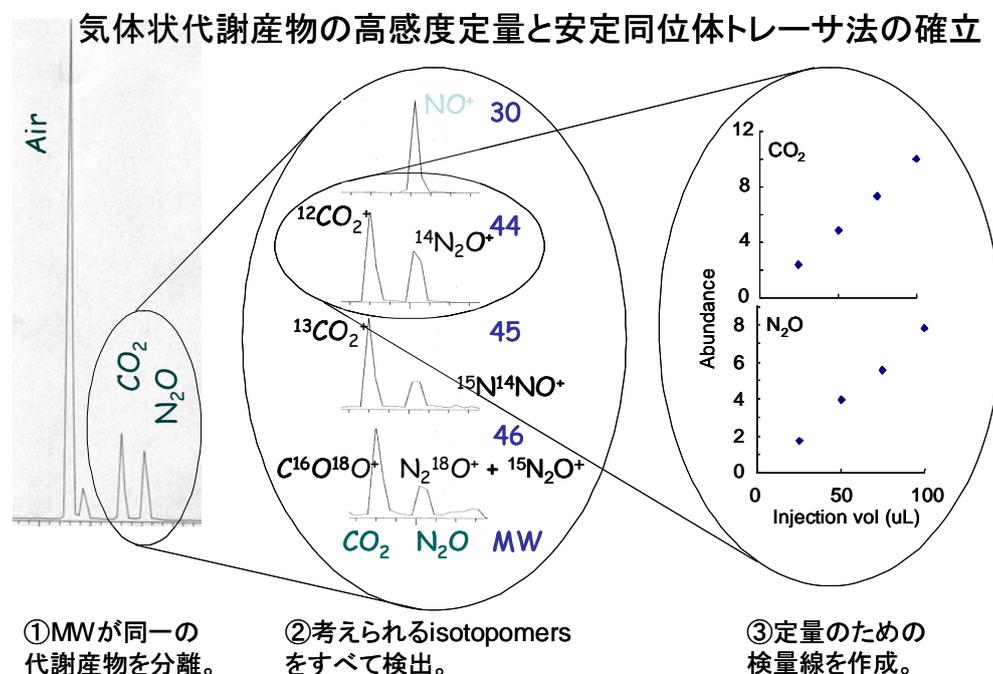


図 10 気体状代謝産物の GC-QMS による測定

4) 安定同位体をトレーサーとした細菌の内生呼吸測定方法の確立

この方法を利用して、実際に細菌の内生呼吸の測定を試みた。内生呼吸で発生する CO_2 を ^{13}C をトレーサーとして定量するため、大腸菌（野生株）を ^{13}C で標識した酢酸塩 ($^{13}\text{CH}_3\text{COONa}$) を入れた培地で培養し、大腸菌バイオマスを ^{13}C で標識した。培養後、遠心して ^{13}C で標識したバイオマスを集め、バッファーで洗浄して余分な ^{13}C 化合物を除いた。このバイオマスをリン酸バッファーに内生呼吸による $^{13}\text{CO}_2$ 発生速度ができるだけ精確に測定できるように十分に低い密度で懸濁し、ブチルゴム栓で密閉した小型バイアルに入れた（図 11）。このとき、酸素の供給が不足することがないように、ヘッドスペースを十分大きくし、 25°C でインキュベートし、一定時間ごとにヘッドスペース中の CO_2 を GC-QMS で定量した。ヘッドスペースには大腸菌の呼吸の結果として2種類の炭酸ガス、すなわち $^{12}\text{CO}_2$ と $^{13}\text{CO}_2$ が蓄積されるが、後者は専ら ^{13}C で標識した菌体バイオマスの貯蔵物質に由来する。

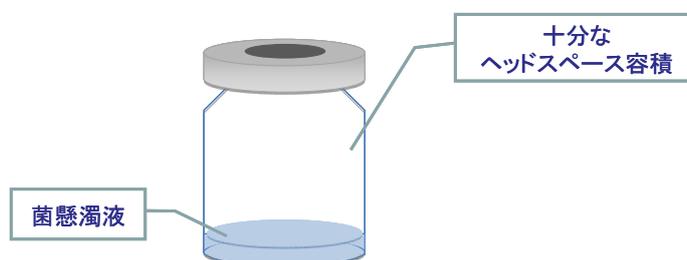


図 11 インキュベーション実験で使用したバイアルの模式図。

実験の結果を図 12 に示した。 ^{13}C -標識菌体をただリン酸バッファーに懸濁して CO_2 放出のタイムコースを求めた実験（図 12 上図）では、若干の $^{12}\text{CO}_2$ の生成が測定されたものの、その速度をおよそ 4.5 倍上回る速度で $^{13}\text{CO}_2$ が生成され、菌体への ^{13}C の標識が十分に行われたこと、およびこの実験系において、内生呼吸 $^{13}\text{CO}_2$ の生成速度として定量できることが示された。

5) 細菌の内生呼吸に対する共存する有機物の影響

ところで、BOD 処理を目的とする廃水処理プロセスにおいては、当然のことながら常に有機物が微生物に供給されている。有機物が供給された条件で内生呼吸が働いているのか否かを知ることは極めて重要である。内生呼吸はエネルギー欠乏状態で検討されることが多かっただけに、こうした検討はわれわれの知る限り十分定量的と思われる検討は過去に行われていない。

ここでの実験では、前節で述べた実験に並行して、リン酸バッファーにグルコースを添加した系での内生呼吸速度の測定も試みた。図 12 の下図に示すように、バッファーにグルコース (^{13}C で標識していない) を添加した場合、グルコース由来の大量ですばやい $^{12}\text{CO}_2$ 生成があったことに加え、グルコース非添加系で見られたと同様に $^{13}\text{CO}_2$ も生成した。このことは、外部からエネルギー減を与えられた場合でも内生呼吸が起こっていることを示す。またその速度はグルコース非添加の場合に比べて若干 (約 15%) 低い程度であり、グルコース添加によって内生呼吸が阻害されたとは認められなかった。

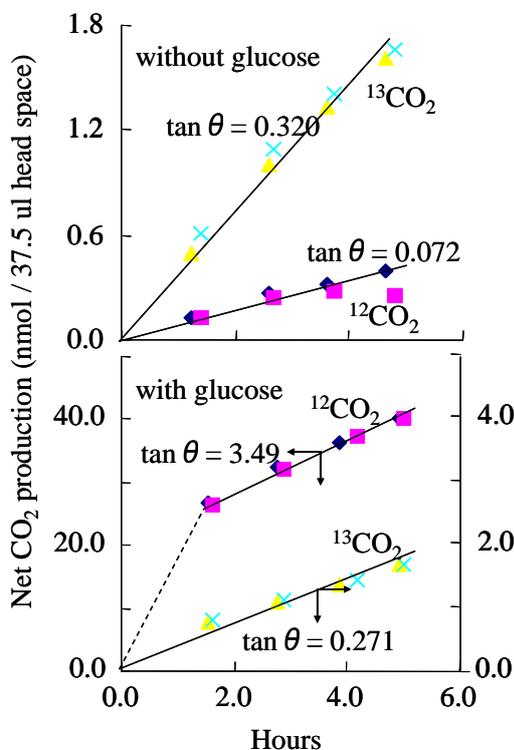


図 12 ^{13}C で標識した大腸菌 (野生株) 菌体の内生呼吸速度の測定 (上図) と、内生呼吸に対するグルコースの影響。内生呼吸は菌体の ^{13}C -標識貯蔵物質由来の $^{13}\text{CO}_2$ の生成速度として測定した。

この結果から、内生呼吸は、宿主細胞が活発に BOD 分解を行っている場合でも、影響を受けない、すなわち、内生呼吸低減菌を分離することは意味があるということを示すことができた。ところで、この解釈に対して、グルコースと BOD では話が違うという質問がでるかもしれない。大腸菌においては、グルコース効果と称されるように、「活発な代謝」のシグナルはグルコースによって発せられる。すなわち、グルコースで影響がなければ、他の化合物での影響もいとかなりの確度で言うことができる。

6) 酸素定量方法の確立

ところで、本研究における最大の目的は酸素の低減である。内生呼吸の低減を貯蔵物質由来の炭酸ガスを測定することで定量的に検討できる実験系を確立できたが、このとき、どれほどの酸素吸収量が低減できたのかを定量的に知ることは本プロジェクトの目的に応えることになる。

そこで、図 11 に示すインキュベーション実験系のヘッドスペース中の酸素を、炭酸ガス分析と同時に GC-QMS で定量するための方法を確立することにした。大気中の酸素分圧はおよそ 19% と極めて高く、そのため、炭酸ガスの分析用に確立した方法では分析時における外部からの混入が大きすぎ、検量線を作成しても原点を通らなかったことは図 9 に示したとおりである。外部からの酸素の混入箇所は、GC-QMS のガス流路すべてであるが、殊更、試料注入時の持込量が最も多いのではないかと推定した。

この問題を解決するため、3つの方法を講じることにした。ひとつはガスタイト・シリンジに入った気体試料を通常の試料導入ポートから直接インジェクトすることは止め、6方あるいは8方バルブに取り付けた定量ループを介して導入することである。ただし、このとき、バルブの切り替え用クラッチ板を廻すとともに大気を咬み込むことが避けられない。したがって、クラッチ板の周りがジャケットで覆われたタイプの6方あるいは8方バルブを使用し、ジャケット部分に超高純度 He を流し続けることでバルブ切り替え部を大気から完全に遮断した。さら

に、インジェクション・ポートもプラスチック製の注射等を囲うしてジャケットとし、そこにも超高純度 He を流し続けてインジェクション時の大気の咬み込みを完全に防止した。GC-QMS に取り付けた自作のインジェクション部の写真を図 13 に示す

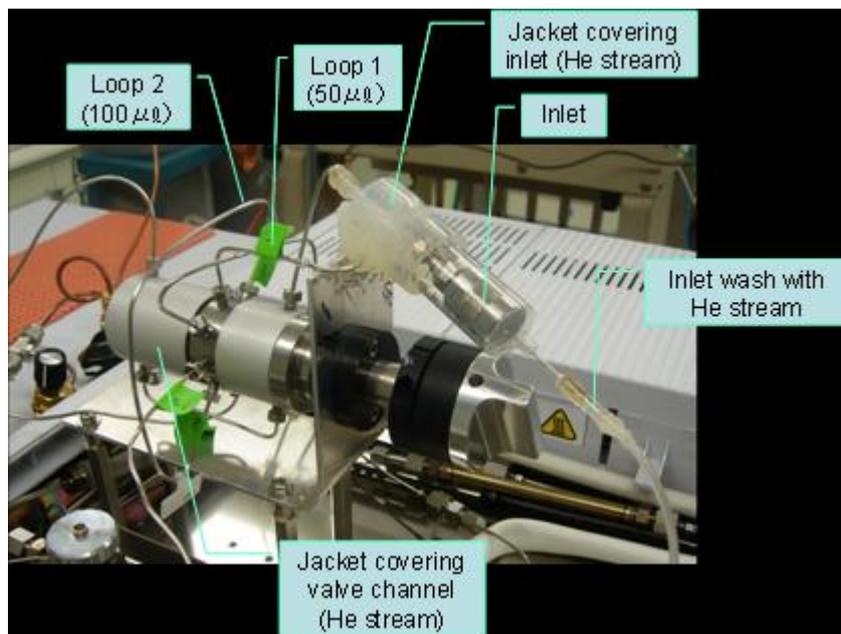


図 13 大気からの酸素の混入を防止するために試作し、GC-QMS に取り付けたインジェクション部の写真。ジャケット付きの 8 方バルブには 2 つの定量ループを付け、インジェクション・ポートもジャケットで覆った。両方のジャケットには超高純度 He を流し続け、大気との遮断を行った。

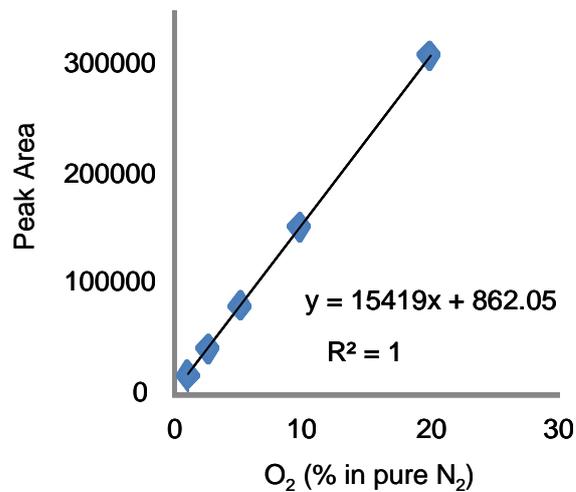


図 14 GC-QMS を用いて作成した O₂ ガスの検量線。

N₂ ガスをバックグラウンドガスとして調製したさまざまな濃度の O₂ ガス標準試料をガスタイト・シリンジで採取し、図 13 に示したセットアップを介して GC-QMS に注入した。

図 13 に示した試料導入のためのセットアップを使用して作成した O₂ ガスの検量線を図 14 に示す。ここで分析したのは N₂ ガスをバックグラウンドガスとして調製したさまざまな濃度の O₂ ガス標準試料であり、8 方ループに付属した 2 本の定量ループのうち 1 本の同じループを使ってピークエリアを求めた。調製した O₂ 濃度とピークエリアには高い直線関係があり、しかもほぼ原点を通ったことから、分析時の大気の混入は最小限にできたことが解った。なお、ここで見られた若干の酸素混入は、必ずしも分析時に起こったとは限らず、標準試料の調製の際に起こった可能性がむしろ高いと見ている。

この検量線を得たと同一の分析条件で CO₂ および N₂O も同時に分析することができた(図 15)。

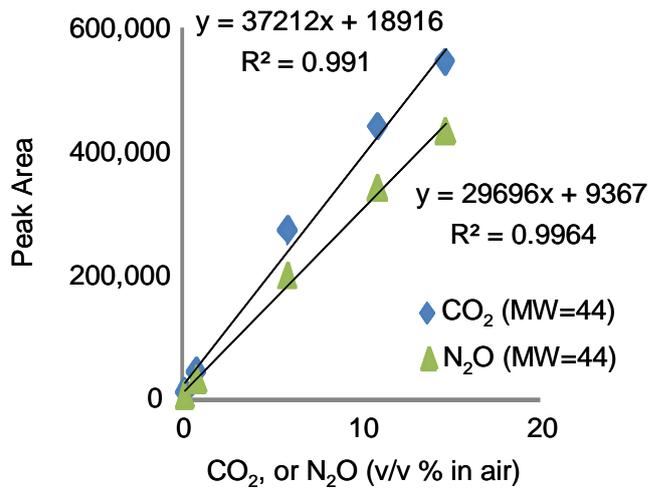


図 15 GC-QMS を用いて作成した CO₂ と N₂O の検量線

いずれも、さまざまな濃度で標準試料を作成し、図 13 に示した注入口を介して GC-QMS に導入して分析した。

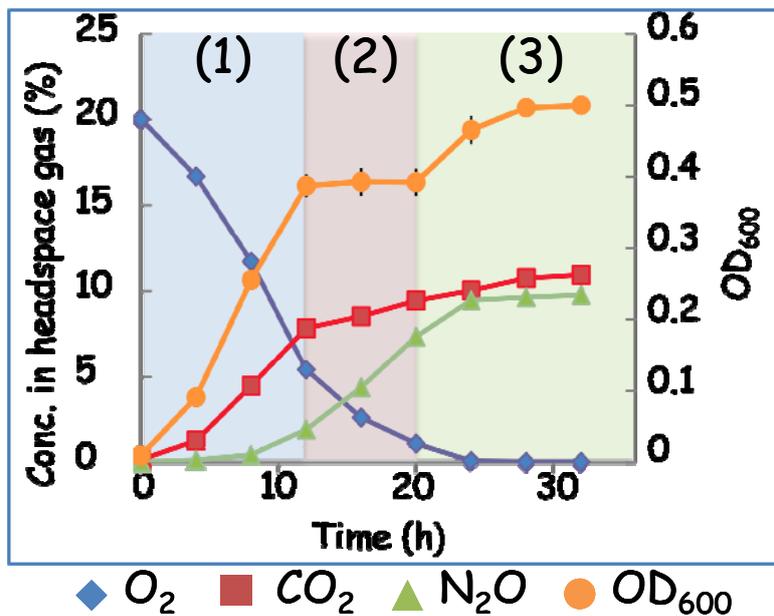


図 16 脱窒細菌 *Pseudomonas* 属の脱窒細菌を密閉したバイアルに入れて培養し、ヘッドスペース中の O₂, CO₂, および N₂O 濃度の経時変化をみたモデル実験の結果。

この分析系を用い、脱窒細菌を密閉したバイアルで培養したときのヘッドスペース中の O₂,

CO₂, および N₂O 濃度を GC-QMS で同時分析するモデル実験を行い、これら 3 つの気体の経時変化をモニターできることが示された (図 16)。この実験では、酸素濃度の減少によって脱窒が誘導される様子がモニターできたことが示されている。ヘッドスペース中の O₂ 濃度が高いあいだ (phase 1) はバイオマスと CO₂ の増加するものの、O₂ 濃度があるレベル以下になると (phase 2)、バイオマスの増加は停止し CO₂ の増加速度も減じ、N₂O の生成、すなわち脱窒が誘導される。脱窒がいったん誘導されてしまうと再びバイオマスが増加した。このように複数種類の気体状代謝産物をモニターすることにより、さまざまな生命現象を定量的に把握することができる。

2. 1. 3 活性汚泥常在菌の内生呼吸

1) 活性汚泥常在菌の分離

節(1)で、大腸菌の代謝の一部を変化させることにより、内生呼吸を低減できることを示した。では、活性汚泥の常在菌の内生呼吸とはどの程度なのであろうか？これを調べるために、排水処理施設二箇所より活性汚泥を採集 (表 4、CH および PE サンプル)、従属栄養細菌を分離した。また、これとは別に、亜硝酸型硝化担体に集積された従属栄養細菌を分離した (表 4、HS および PA サンプル)。

| 試料名称 | MLSS | 分離源 |
|------|--------------|---------------------|
| CH | aplx. 10,000 | 千葉 N 下水処理場返送汚泥 |
| PE | aplx. 2,000 | 千葉 M 厨房排水処理場汚泥 |
| HS | aplx. 50 | 加熱処理担体 (亜硝酸型硝化担体) |
| PA | aplx. 50 | アルカリ処理担体 (亜硝酸型硝化担体) |

表 4 活性汚泥常在菌の分離に用いた試料

これらのサンプルを生理食塩水にけん濁・希釈後、1/5 濃度の LB Agar（貧栄養寒天培地）に塗布、25℃で約一週間培養した。このプレートに現れたコロニーについて、コロニー形態がなるべく異なるものを選び、全部で 200 株を分離した。これらの株より DNA を分離し、16S rRNA 遺伝子部分配列（約 350 bp）を決定した。分離源が同じで、16S rRNA 遺伝子配列が同じ、かつコロニー形態が類似なものを排除し、32 株を保存した。但し HS サンプルから分離した 6 株の中には、16S rRNA 遺伝子配列がほぼ同じで、かつコロニー形態が類似なものが含まれている。これらの株については、16S rRNA 配列（1, 200 bp 以上）を決定し、属および種を推定した（表 5）。

Source = CH

| Strain name | Genus species |
|-------------|-------------------------|
| A2 | <i>Bacillus cereus</i> |
| A3 | <i>Bacillus cereus</i> |
| C2 | <i>Bacillus cereus</i> |
| A4 | <i>Bacillus</i> sp. |
| B5 | <i>Enterobacter</i> sp. |
| A5 | <i>Serratia</i> sp. |
| F2 | <i>Sphingopyxis</i> sp. |
| F3 | <i>Sphingopyxis</i> sp. |
| C1 | <i>Sphingopyxis</i> sp. |
| C3 | <i>Sphingopyxis</i> sp. |

Source = PE

| Strain name | Genus species |
|-------------|--|
| F6 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| A1 | <i>Bacillus subtilis</i> |
| D2 | <i>Comamonas</i> sp. |
| F5 | <i>Klebsiella</i> sp. |
| F4 | <i>Klebsiella</i> sp. |
| D4 | <i>Paracoccus marius</i> |
| D1 | <i>Pseudomonas syringae</i> |
| D3 | <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> |
| C4 | <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> |
| F7 | <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> |

Source = HS

| Strain name | Genus species |
|-------------|------------------------------------|
| E1 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> |
| E2 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> |
| E3 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> |
| E4 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> |
| E5 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> |
| E6 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> |

Source =PA

| Strain name | Genus species |
|-------------|-----------------------------------|
| E7 | <i>Achromobacter</i> sp. |
| B4 | <i>Arthrobacter protophormiae</i> |
| B3 | <i>Arthrobacter soli</i> |
| F1 | <i>Arthrobacter</i> sp. |
| B1 | <i>Brevundimonas vesicularis</i> |
| B2 | <i>Brevundimonas vesicularis</i> |

表 5 四つの試料から分離した菌の属および種名

サンプル CH (返送汚泥) からの分離株は多様性が少なく、*Bacillus* および *Sphingopyxis* が多く分離された。厨房排水処理場汚泥からの分離株には、*Stenotrophomonas acidaminiphila* が多かった。サンプル HS (熱処理担体) からは、*Stenotrophomonas rhizophila* しか分離できなかった。一方、サンプル PA (アルカリ処理担体) からは、*Arthrobacter*、*Brevundimonas vesicularis* 等が分離された。

2) 内生呼吸と外生呼吸の測定法

分離したそれぞれの株を LB 培地中、30℃で一晩 (14 時間) 培養した。4℃で 10,000 rpm、5 分間遠心し、沈降した細胞を、100 mM リン酸バッファー (pH 7.4) にけん濁した。再度、4℃で 5,000 rpm、5 分間遠心し、同じバッファーにけん濁した。この細菌浮遊液を、30℃で振とうしながら、一定時間保った後、クラーク型酸素電極を用い、30℃で、細菌の呼吸速度を測定した。リン酸バッファーにけん濁された直後から 30 分間は、呼吸速度が急速に減少する場合が多かった。一方、けん濁後 2-3 時間での呼吸速度は、ほぼ一定であった。LB 培地よりリン酸バッファーに移した直後では、代謝され易い代謝中間体が菌体内に残って呼吸速度が高いが、それ

を消費した後は、貯蔵物質がほぼ一定の速度で徐々に消費されるのであろう。そこで、リン酸バッファーにけん濁後 2 時間および 3 時間での呼吸速度の平均を、内生呼吸速度と定義した。

また、このけん濁液に LB を 1/30 量加えると、呼吸速度は著しく促進された。この時の呼吸速度を、（内生呼吸＋外生呼吸）速度と定義した。

測定に用いたけん濁液を遠心し、集めた菌体を 110°C で 2 時間乾燥させ、乾重量を測定した。呼吸速度は、 O_2 consumed per min per mg dry weight で表わした。

3) 内生呼吸と外生呼吸

分離した細菌を培養し、そのけん濁液の酸素消費量をクラーク型酸素電極を用いて測定した。このけん濁液に外から基質を与えない時の酸素消費を内生呼吸、LB 培地あるいはグルコースなどの基質を与えた時の酸素消費量を外生呼吸とした。測定は独立に複数回行い、その平均値を算出した。標準誤差は細菌毎で異なるが、測定値の 30% 程度のものが中心であった。代表的な結果を表 6 に示した。

| Source | Genus species | r ₁ | r ₂ | Ratio |
|--------|--|----------------|----------------|-------|
| Human | <i>Escherichia coli</i> (strain K-12) | 394.5 | 9.8 | 40.3 |
| HS | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (strain E3) | 281.5 | 9.9 | 28.4 |
| CH | <i>Enterobacter</i> sp. (strain B5) | 413.0 | 15.7 | 26.4 |
| PE | <i>Comamonas</i> sp. (strain D2) | 205.5 | 7.9 | 26.2 |
| PA | <i>Achromobacter</i> sp. (strain E7) | 325.5 | 13.1 | 24.9 |
| PA | <i>Arthrobacter</i> sp. (strain B4) | 294.0 | 14.4 | 20.4 |
| HS | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (strain E1) | 293.0 | 15.2 | 19.3 |
| PE | <i>Comamonas</i> sp. (strain D2) | 323.5 | 20.7 | 15.7 |
| CH | <i>Pantoea agglomerans</i> (strain A5) | 176.0 | 11.9 | 14.8 |
| PE | <i>Stenotrophomonas</i> (strain D3) | 278.0 | 19.4 | 14.4 |
| PE | <i>Acinetobacter</i> sp. (strain F6) | 341.5 | 27.6 | 12.4 |
| HS | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (strain E2) | 382.0 | 37.9 | 10.1 |
| PE | <i>Paracoccus</i> sp. (strain D4) | 271.0 | 28.0 | 9.7 |
| PE | <i>Pseudomonas syringae</i> (strain D1) | 304.5 | 45.6 | 6.7 |
| PA | <i>Brevundimonas vesicularis</i> (strain B2) | 213.0 | 33.5 | 6.4 |
| PA | <i>Brevundimonas vesicularis</i> (strain B1) | 186.0 | 32.9 | 5.7 |
| CH | <i>Sphingopyxis</i> sp. (strain F2) | 135.0 | 37.6 | 3.6 |
| CH | <i>Bacillus cereus</i> (strain A3) | 251.0 | 76.9 | 3.3 |
| CH | <i>Bacillus</i> sp. (strain A4) | 131.0 | 53.0 | 2.5 |
| CH | <i>Bacillus cereus</i> (strain A2) | 119.5 | 49.4 | 2.4 |
| PE | <i>Bacillus subtilis</i> (strain A1) | 27.5 | 11.8 | 2.3 |

表6 活性汚泥等から分離した細菌の内生呼吸と外生呼吸

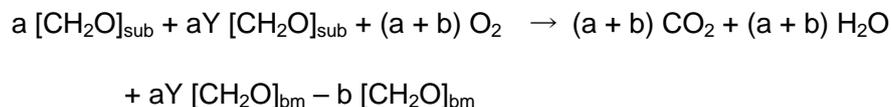
活性汚泥等から分離した細菌を LB 培地 30°Cで振とう培養した後、100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) にけん濁。その後、30°Cで 2-3 時間振とう培養し、菌体の呼吸速度を酸素電極を

用いて測定。この呼吸速度を内生呼吸速度 (r_2) とした。同様に培養した菌液に LB を 1/30 量添加した時の呼吸速度を、(内生呼吸+外生呼吸) とし、外生呼吸速度 (r_1) を計算。呼吸速度の単位は、 $\mu\text{g oxygen consumed per h per mg dry weight}$ 。

BOD 分解における酸素消費効率を示すパラメーターとして、外生呼吸速度と内生呼吸速度の比 (R) を用いることができる。この比は、活性汚泥構成菌の種類によってまちまちであった。この比が高い、すなわち、酸素消費効率の高い菌としては、*Enterobacteriaceae* に属する *Enterobacter* sp. B5 株や *Escherichia coli* をあげることができる ($R > 25$)。一方、*Bacillus* 属の菌は、酸素消費効率が低かった ($R < 3$)。活性汚泥中に酸素消費効率が高い菌を優占化させることができれば、曝気効率は上昇するものと考えられる。

4) 菌体収率と世代時間との関係 (酸素十分条件下)

ここで、BOD 分解における細菌の増殖について考える。BOD 分解と増殖とは、以下の式で記述できる。ここで Y は菌体収率である。



$[\text{CH}_2\text{O}]_{\text{sub}}$: 基質

$[\text{CH}_2\text{O}]_{\text{bm}}$: Biomass

a : 外生呼吸量 = $r_1 \times X(t) \times t$ [$X(t)$: 菌体量 ; t : 時間]

b : 内生呼吸量 = $r_2 \times X(t) \times t$

Y : 菌体収率 (mol cell mass/mol of oxygen)

この関係式から、(a + b) モルの酸素を消費して、a(1 + Y)モルの基質 (BOD) が分解されることが解る。すなわち、BOD 分解のための酸素消費効率を考えるならば、上式から、

$$E (\text{酸素消費効率}) = a(1 + Y)/(a + b)$$

と表現されるべきであろう。しかし、菌体収率を実験的に求めることは容易ではない。

一方、対数増殖期にある細菌では、以下の関係が成立する。

時刻 t での菌濃度を $X(t)$ とする。 dt の間での $X(t)$ の増加 $dX(t)$ は：

$$dX(t) = X(t) [r_1 Y - r_2] dt$$

$$X(t) = X_0 \times \exp(k \times t) \quad (1)$$

但し、 $k = r_1 Y - r_2$ である。一方、対数増殖の式は、

$$X(t) = X_0 \times 2^{(t/T)} \quad (2)$$

但し、 T は世代時間である。(1)式と(2)式を比較して、

$$r_1 Y - r_2 = \ln 2 / T$$

すなわち、 r_1 、 r_2 、 T を測定すれば、 Y は推定できる。

そこで、対数増殖期にある細菌の世代時間 T を求め、増殖収率 Y を計算し、酸素消費効率を計算することとした。

5) 曝気槽内での酸素の利用効率

曝気槽内で、基質を完全分解するのに必要な菌体量を X_{\min} 、時刻 t の菌体量を $X(t)$ とする。

その場合、基質が完全分解された時点での酸素利用効率 E は：

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

$X(t)$ と X_{\min} との比、すなわち、廃水処理に最小限必要なバイオマスの何倍のバイオマスが曝気槽内に存在するかを f で表せば：

$$f = X(t) / X_{\min}$$

$$E = [(1 + Y) \times r_1] / [r_1 + f \times r_2]$$

この式は、基質が完全分解される前に酸素が消費されてしまった場合にでも成立するが、基質が分解された後については内生呼吸による酸素消費のみが起こるわけであるから、酸素利用効率は、 E の値よりもどんどん下がっていく。

ちなみに、基質が完全分解される以前においては、BOD 酸化反応による酸素消費と、内生呼吸による酸素消費との比は：

$$r_1 : f \times r_2$$

である。

以上の関係を用い、酸素利用効率と f との関係を求めた。その一部を図 17 に示してある。この際、増殖効率 Y については、各分離株の世代時間より求めて計算を行っている。

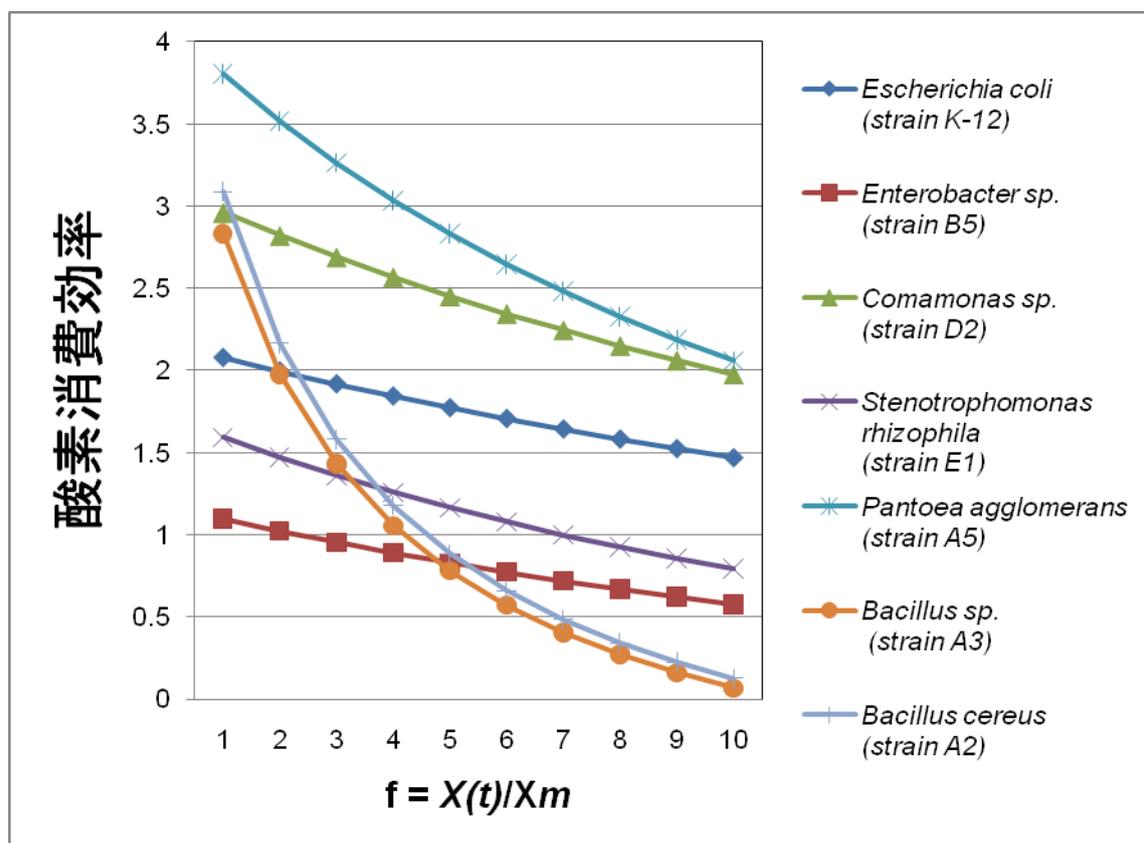


図 17 酸素利用効率と f との関係

基質の処理に必要な最小限の MLSS、 $X(t) = X_{\min}$ を用いた場合、すなわち $f=1$ の条件下で、当然のことながら、酸素利用効率が最大である。しかし、実際の活性汚泥の運転においては、それよりもはるかに高い MLSS での運転が行われているから、酸素利用効率は f に従って減少する。ここで、内生呼吸率の高い *Bacillus* 属においては、 f に依存する減少量が、内生呼吸率の低い細菌に比べて著しいことがわかる。

6) 酸素不十分条件下での BOD 分解

以上の結果と考察から、内生呼吸と外生呼吸の比、(内生呼吸) / (外生呼吸)、が高い値を持つ細菌による BOD 処理は、酸素不十分条件下では効率が悪いこと、すなわち、供給された酸素のほとんどが内生呼吸で消費されてしまう結果、BOD 分解が阻害されるであろうことが予想された。そこで、これを実験的に示すことにした。BOD を実験的に定量することは手間がかかり、また、誤差も大きいことから、ここでは、 ^{13}C -グルコースを外生の基質として加え、 $^{13}\text{CO}_2$ の発生量を“酸素消費に伴った BOD 分解量”として捉え、また、その時発生した $^{12}\text{CO}_2$ の発生量を内生呼吸量とした。 $^{12}\text{CO}_2$ および $^{13}\text{CO}_2$ の測定については GC-QMS 法を用いた。

内生呼吸の低い株 (*Enterobacter* sp. B5 株) と、と内生呼吸の高い株 (*Bacillus* sp. A3 株) を選び、酸素不十分条件下 (利用できる酸素濃度が、0.23、1.2 および 2.0 mM) での、外生呼吸によるグルコース分解量を測定した。もちいた細菌の濃度は、 f の値で 10 に相当するようにした。*Enterobacter* sp. B5 株においては、上記いずれの酸素濃度でも酸素利用効率はほぼ一定で、約 0.6 であった (注：この実験では、菌の増殖に伴うグルコースの菌体への取り込みを考慮していない：すなわち、前述の式で $Y = 0$ と仮定した時の酸素利用効率を測定していることになる)。一方、*Bacillus* sp. A3 株における酸素利用効率は、酸素濃度が低い条件から順に、0.02、0.11、0.16 となった。

この結果から、(1) 基質 (BOD) の好氣的分解は酸素が十分に供給されない条件では内生呼吸によって制限されること、(2) その結果、内生呼吸が高い細菌では、低い細菌に比べて、BOD

の分解が低下することが示された。内生呼吸が高い細菌の方が低い細菌よりも BOD 分解において不利であろうとの感触は、多くの研究者が持っているところであるが、それを実験的に証明したのは、我々が知る限り、本研究が世界初となる。

7) 分離した細菌の資化性

以上の結果から、酸素利用効率の高い菌を固定化し BOD 処理を行えば、内生呼吸による酸素消費を減少させ、ひいては、処理場における電力消費量を減少できると思われる。しかし、汚水処理施設には様々な有機物が流入してくるため、単独、あるいは少数の細菌の組合せで BOD 処理をするためには、それらの細菌は、広い有機化合物に対して資化性を示すものでなければならない。

そこで、本研究で分離した細菌の資化性を、API 50CH を用いてテストした。結果の一部を表 3 に示した。一つの化合物に対して資化性を示した場合、スコアを+1、弱い資化性を示した場合はスコアを+0.5 とし、それぞれの分離株について、その合計スコアを比較した。

| Substrate | <i>Bacillus subtilis</i> A1 | <i>Bacillus cereus</i> A2 | <i>Brevundimonas</i> sp. B1 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> E1 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> E2 |
|----------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glycerol | 1 | 0.5 | 0 | 1 | 0 |
| L-arabinose | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Ribose | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| D-xylose | 0.5 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| Galactose | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| D-glucose | 1 | 1 | 0 | 1 | 0.5 |
| D-fructose | 1 | 0.5 | 0 | 1 | 0.5 |
| D-mannose | 1 | 0 | 0 | 1 | 0.5 |
| Rhamnose | 0 | 0 | 0.5 | 0 | 0 |
| Inositol | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Manitol | 1 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| Sorbitol | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| a-methyl-D-mannoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| a-methyl-D-glucoside | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| N-acetyl glucosamine | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Amygdalin | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.5 |
| Esculin | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Salicin | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Celobiose | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Maltose | 1 | 1 | 0.5 | 1 | 1 |
| Lactose | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.5 |
| Melibiose | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Sucrose | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Trehalose | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Inulin | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Melezitose | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| D-raffinose | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| Starch | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Glycogen | 0 | 0.5 | 0 | 1 | 0 |
| Xylitol | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| b-gentiobiose | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.5 |
| D-turanose | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| Score | 14.5 | 8.5 | 2 | 20.5 | 5 |

表 7 API を用いた資化性検定：0：資化せず、0.5：弱い資化、1：資化

このテストで、高い資化性を持っていると思われた分離株を表 8 に示している。*Enterobacter* sp. B5 は資化性にも優れていることが示された。

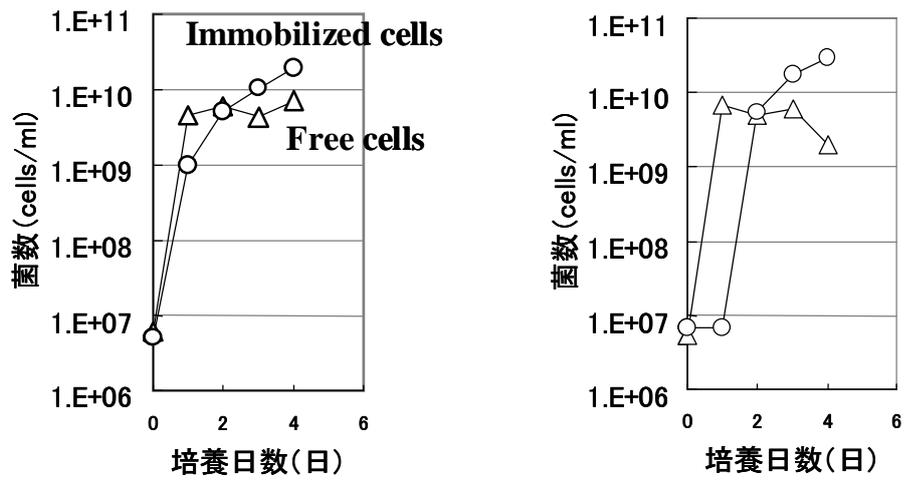
| | |
|---|------|
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E10 | 38.5 |
| <i>Enterobacter</i> sp. strain B5 | 37 |
| <i>Pantoea agglomerans</i> strain A5 | 33.5 |
| <i>Bacillus subtilis</i> strain A10 | 25.5 |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E1 | 23.5 |
| <i>Escherichia coli</i> K-12 | 23 |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain 2 | 21 |
| <i>Arthrobacter protophormiae</i> strain B4 | 20 |

表 8 資化性ベスト 8

2. 1. 4 有用菌の安定維持方法

1) 純粋菌の包括固定化

内生呼吸低減菌を活用するための菌保持方法について検討した。標準菌 (*Pseudomonas* sp. や *Serratia* sp.) の純粋培養液を用いて包括固定化し担体を得た。その担体を Nutrient broth で培養した結果、包括固定化ゲル内部で菌が増殖すること、free の細胞のほうが増殖速度が速いが、菌体保持量は包括固定のほうが大きいことを明らかにした。(図 17) またアルギン酸ソーダで包括固定した担体をさらに PEG で包括固定化する 2 重包括により、菌の漏れが無く、純粋菌を安定して保持できることを見出した。(図 18) これらの手法により内生呼吸低減菌を保持するための幾つかの指針を明らかにすることができた。



a) *Pseudomonas* sp.

b) *Serratia* sp.

図 17 純粋菌の増殖特性

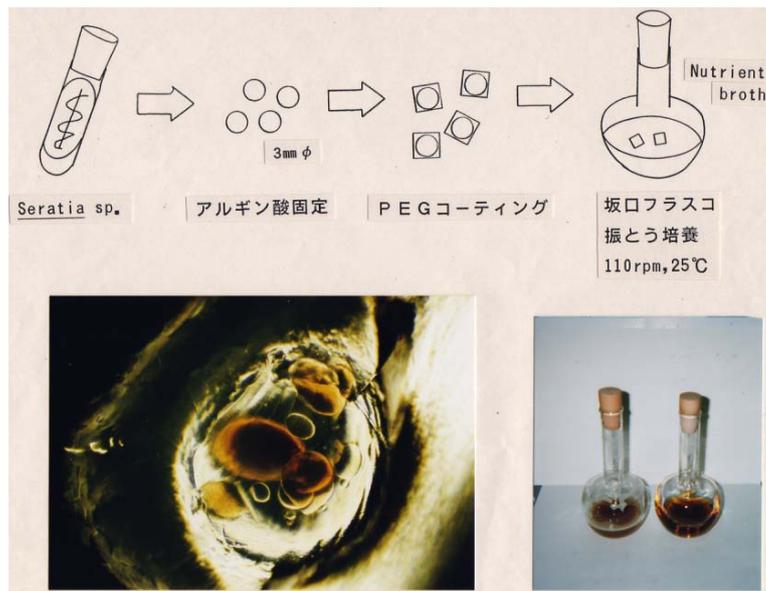


図 18 2重包括固定化による培養

左下：ゲル内部で増殖した *Serratia* 菌コロニー

右下：培養液には free の菌は漏出せず

さらに、標準菌（酵母とアンモニア酸化細菌）の純粋培養液を用いて包括固定化担体を得、それぞれの微生物の増殖特性を測定した。先に報告した標準菌（*Pseudomonas* sp. や *Serratia* sp.）と同様に包括固定化ゲル内部で菌が増殖することを確認した。アンモニア酸化細菌は活性汚泥と共存下で固定化するとラグフェーズがなく増殖しやすいことを明らかにした。純粋分離菌を包括固定化するための固定化材料として分子量 4,000 のプレポリマーを選定した。この材料を用いた包括固定化担体の製造は、既設の担体大量生産設備（日立プラントテクノロジー松戸担体製造工場）で生産が可能であることを確認した。

2) 包括固定化担体利用によるコンタミネーション防止技術

廃水中には多くの雑菌が混在しており、実廃水で固定化菌を用いる場合、雑菌によるコンタミネーションを抑制する手段が必要である。実用可能な手段として担体の酸・アルカリ処理（pH ショック）によるコンタミネーション抑制効果を、硝化反応をモデルに検討した。トレーサ菌としてアンモニア酸化細菌（AOB：Ammonia-oxidizing bacteria）と亜硝酸酸化細菌（NOB：Nitrite-oxidizing bacteria）を包括固定化した担体を用い、NOB 抑制方法を検討した。連続硝化実験装置を図 19 に示す。容積 10L の硝化槽へ包括固定化担体を 10% 添加しアンモニア（ NH_4 ）を注入し曝気処理した。

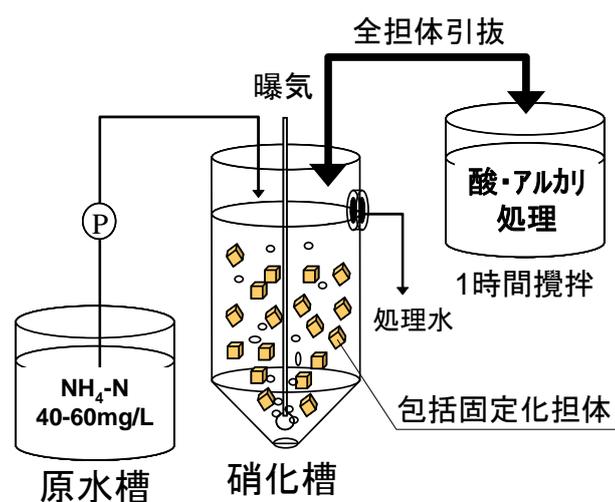


図 19 連続硝化実験装置

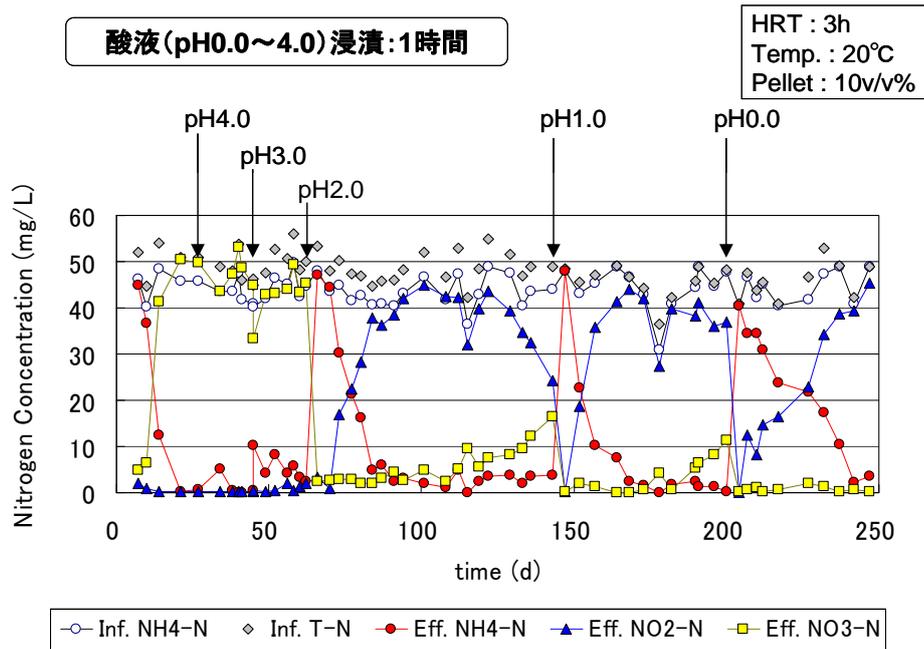


図 20 酸処理担体による無機合成廃水の連続処理

全担体を取り出し各 pH の酸液へ浸漬、中和後返槽

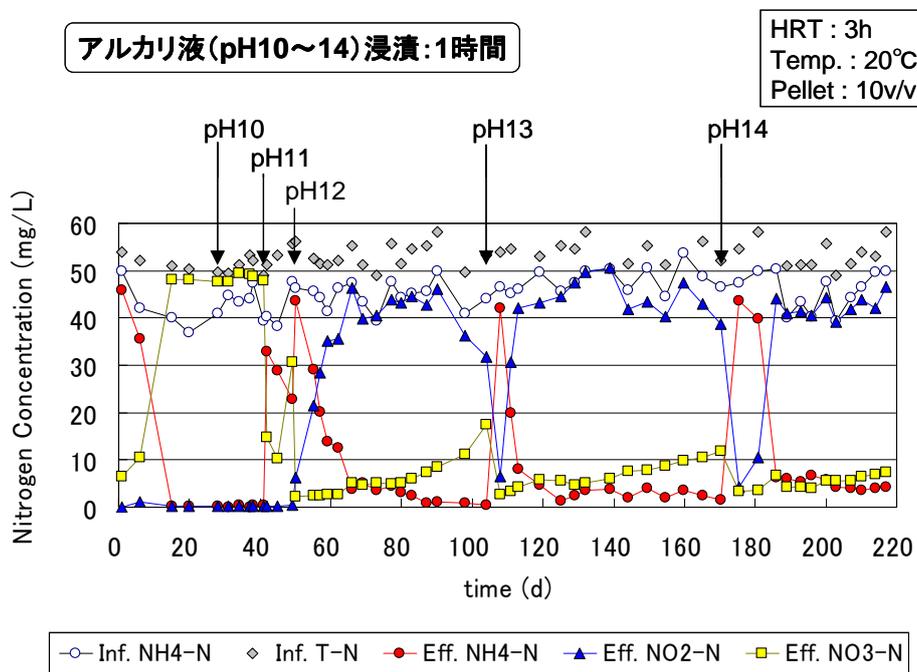


図 21 アルカリ処理担体による無機合成廃水の連続処理

全担体を取り出し各 pH のアルカリ液へ浸漬、中和後返槽

連続硝化実験結果を図 20 および図 21 に示す。その結果、酸溶液 (pH2.0 以下) もしくはアルカリ溶液 (pH12<) に 1 時間担体を浸漬処理することにより、固定化担体の有用な AOB は生かしつつ、不要な NOB の増殖を抑制させることが十分可能であることを見出した。

3) 内生呼吸低減菌の安定維持方法の検討

実排水処理施設から採取した加熱処理担体 (90℃温水, 1 時間浸漬処理) およびアルカリ処理担体 (pH13 アルカリ溶液, 1 時間浸漬処理) を作製し、それぞれの担体から内生呼吸低減菌を複数種単離した (表 8)。それらの中から加熱処理担体由来の

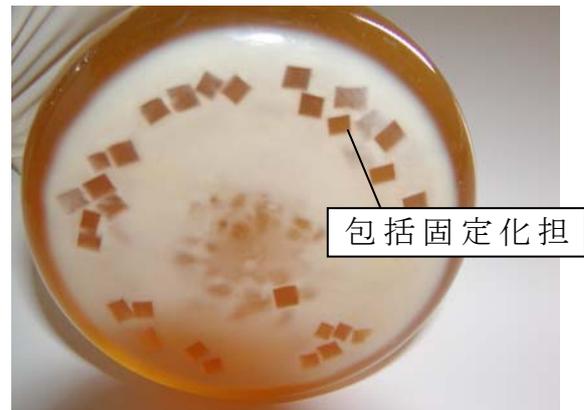


図 22 再増殖した *Arthrobacter sp.* B4 株

Stenotrophomonas rhizophila E1 株, アルカリ処理担体由来の *Arthrobacter sp.* B4 株, *Achromobacter sp.* E7 株を増殖後回収し包括固定化した担体 (3mm 立法角) を作製し, pH ショック (pH13, 1 時間) 後の再増殖能を評価した。その結果, pH ショック後の各担体を中和し滅菌済みナイフで分割後, 滅菌済み LB 培地内で培養したところ, いずれの担体においても図 22 に示すような細菌の再増殖が確認され, これまで検討してきたアンモニア酸化細菌意外においても, 目的とする微生物活性は維持しつつ, 目的外の微生物を選択的に排除することが十分可能であることを確認した。

以上、報告したように内生呼吸低減率では目標値 35% に対し 40% と大幅に低減できる菌を見出した。また内生呼吸低減菌を保持する手段として包括固定化方法での純粋菌の増殖を確認し、固定化材料として分子量 4,000 のプレポリマーを選定した。またコンタミ防止策として、包括固定化担体をアルカリ処理する手法を用いることで、内生呼吸低減菌の安定保持が可能になることを見出した。なお、排水中の有機物は硝酸呼吸にも消費されるため、内生呼吸低減菌による曝気量低減効果は、BOD/N 比が 3 以上の廃水において有効な手法だと考えられる。

2. 1. 5 亜硝酸型硝化技術の評価

代表的な窒素処理法である硝化・脱窒反応では、まず好気槽内で廃水中のアンモニアを AOB の働きによって亜硝酸 (NO_2) へ酸化し、更に NOB の働きによって NO_2 から硝酸 (NO_3) へ酸化させる (硝化反応)。次に嫌気槽内において、 NO_3 から NO_2 へ還元し、続いて NO_2 から N_2O 、さらに N_2 ガスへ還元させる (脱窒反応)。つまり、従来の硝化・脱窒反応は NO_2 から NO_3 への酸化反応と NO_3 から NO_2 への還元反応において無駄な往復反応をしていると言え、その原因となる NOB 活性を抑制することができれば、硝化槽で酸素消費量を理論値で最大 25% 削減できる。また、脱窒反応に必要なメタノール供給量も理論値で最大 40% 削減できる。NOB 活性を抑制した亜硝酸型硝化技術の開発の歴史は古く、これまでに好気槽内の溶存酸素濃度を低下させる方法や、好気槽内の遊離アンモニア濃度を上昇させる方法、好気槽内塩濃度を高く維持する方法等が提案されてきた。しかしながら、これらの方法は処理環境の変化により、NOB 活性の抑制が極めて不安定となる課題があった。

そこで本研究開発では、「2. 1. 4 有用菌の安定維持方法」で検討した pH ショック法により NOB 活性を抑制する亜硝酸型硝化技術を評価した。

1) 亜硝酸型硝化の酸素およびメタノール消費量の削減効果

硝化反応に必要な酸素と脱窒反応に必要なメタノールの供給量低減を目的として、硝化細菌の包括固定化担体をアルカリ溶液へ一時的に浸漬処理することによって、アンモニア酸化活性を維持しつつ亜硝酸酸化活性のみを抑制する pH ショック法の酸素消費とメタノール消費量の低減効果を評価した。

亜硝酸型硝化プロセスと脱窒プロセス組み合わせた循環変法による硝化・脱窒処理装置を用いた。処理装置を図 23 に、仕様を表 9 に示す。塩ビ製の硝化槽と脱窒槽を連結し、脱窒槽に攪拌機、硝化槽に散気装置を設置した。硝化槽に担体 10%、脱窒槽に担体 20% を充填し、硝化槽の溶存酸素濃度 (DO : Dissolved Oxygen) 5 mg/L 以上、水温 20°C、硝化槽 HRT3.0 時間の条件で無

機合成窒素廃水を連続通水した。脱窒処理に必要なメタノールは原水 T-N の 2～3 倍程度となるように脱窒槽へ添加した。連続処理実験の原水として、表 10 に示す無機合成窒素廃水 ($\text{NH}_4\text{-N}$ 40mg/L) を使用した。使用した担体は、ポリエチレングリコール系のプレポリマーにより活性汚泥を包括固定化したものであり、当社の担体造粒工場にて製造、成型した担体を用いた。担体中の汚泥含有量は重量比で 2% であり、担体の形状は 3mm 角の立方体のものである。

まず、実験開始時は硝化槽のみで立ち上げ運転し、その後、前段に脱窒槽を配置し循環変法（循環比 2:循環量/原水量）の運転に切り替え、脱窒処理が安定した後、全硝化担体を引抜き pH ショック処理 (pH13, 1 時間) した。

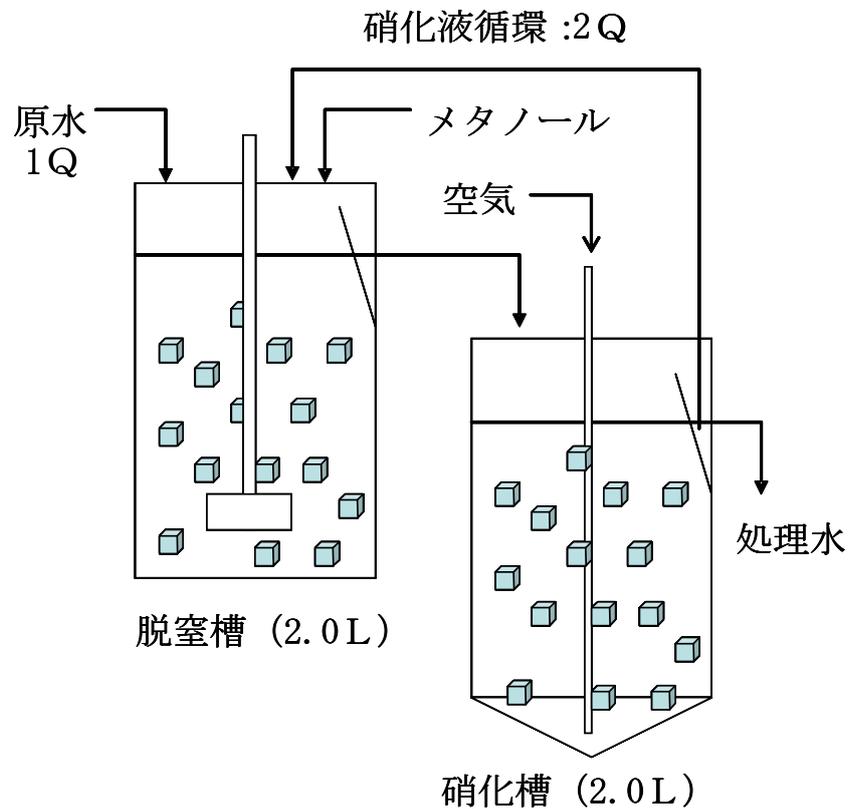


図 23 硝化・脱窒処理装置（循環変法）

| 項目 | 硝化槽 | 脱窒槽 |
|-------|---------------------|---------------|
| 材質 | 透明塩化ビニル製 | |
| 容積 | 2.0L | |
| 寸法 | φ 150mm×H300mm | |
| 配管 | 透明塩化ビニルチューブ | |
| 充填担体 | ポリエチレングリコール系プレポリマー製 | |
| 担体充填率 | 10% | 20% |
| 付属機器 | ブロアー (40L/min) | 攪拌機 (~600rpm) |

表 9 硝化・脱窒処理装置仕様

| 項目 | 濃度 (mg/L) |
|--|-----------|
| $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ | 94.0 |
| NaHCO_3 | 468 |
| NaCl | 20.4 |
| KCl | 9.60 |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 46.4 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 33.6 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 9.60 |

表 10 無機合成窒素廃水の組成

硝化・脱窒処理実験の結果を図 24 に示す。まず通常の硝酸型硝化処理を立上げ、その後循環変法による硝化・脱窒処理へ移行した。脱窒活性が安定した運転 35 日目に全担体を対象に pH ショック処理 (pH13, 1 時間) を行った結果、その後 77 日間に渡り処理水に $\text{NO}_3\text{-N}$ がほとんど残存せず、 $\text{NO}_2\text{-N}$ のみが 4~12mg/L 残留する亜硝酸型硝化の状態を維持できた。

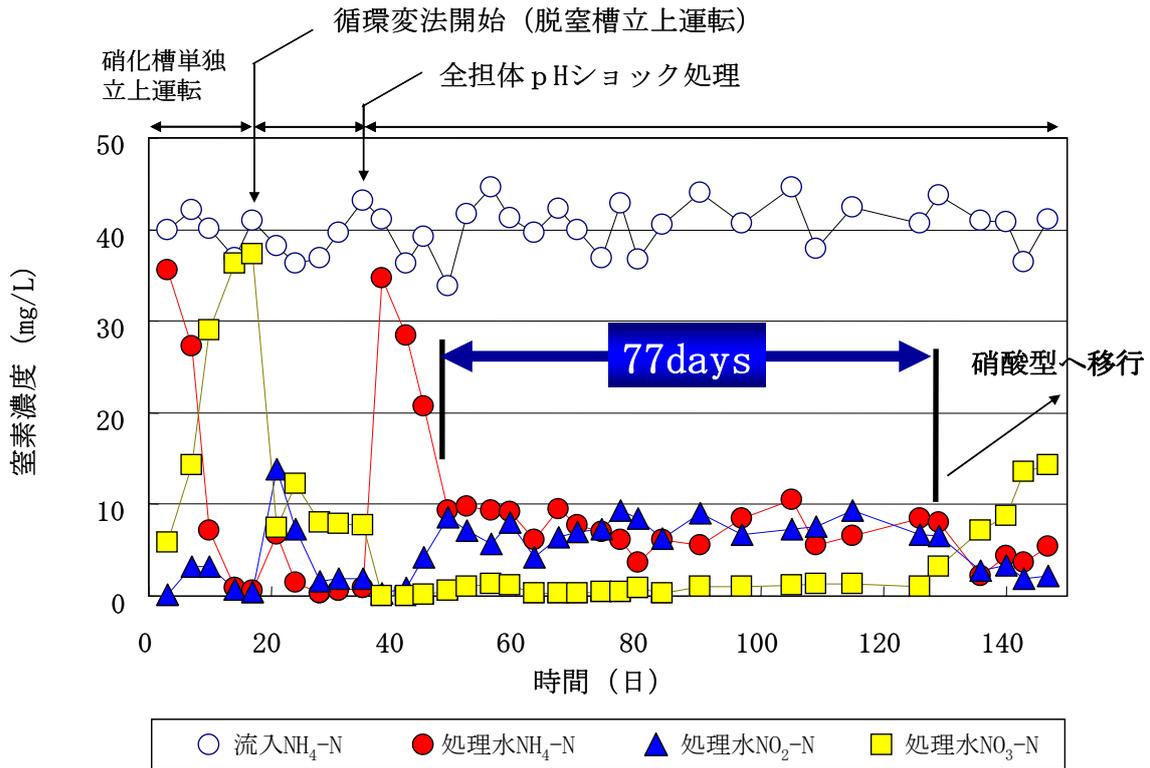


図 24 連続硝化・脱窒処理結果 (循環変法)

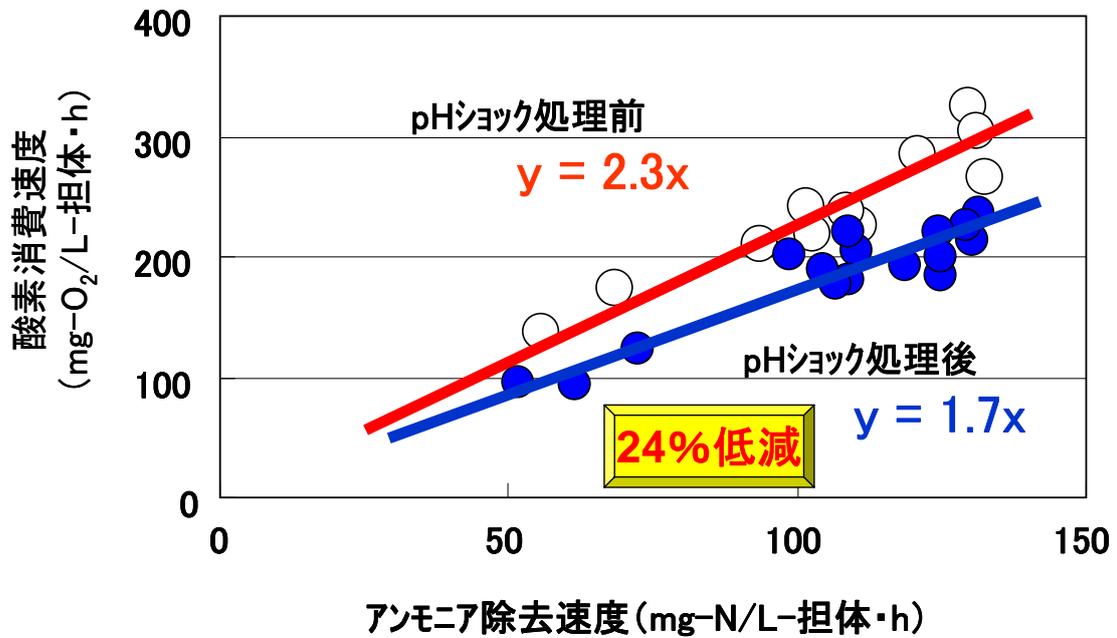


図 25 各担体の酸素消費速度およびアンモニア除去速度の比較

pH ショック処理前後の担体を一定量取出し、それぞれの酸素消費速度およびアンモニア除去速度を求め比較解析した結果を図 25 に示す。その結果、pH ショック後の亜硝酸型硝化担体は通常の硝化担体に比べ酸素消費量が平均で 24%削減され、理論値と同等となることを確認した。

理論上、亜硝酸からの脱窒は硝酸からの脱窒にくらべ、水素体供給量が 40%削減できることが知られている。これまでの高濃度アンモニア処理実験における実測値においても脱窒反応におけるメタノール/N 比は、硝酸からの脱窒で 2.3~3.0, 亜硝酸からの脱窒で 1.4~2.0 となり、亜硝酸からの脱窒はメタノール供給量を 33~39%削減できることを確認している。

本実験における脱窒反応のメタノール/T-N 比を、メタノール消費量と脱窒した窒素量から求めた結果を図 26 に示す。その結果、硝酸型硝化処理状態（運転 28, 31, 35 日目）のメタノール/T-N 比の平均値は 2.8 であったのに対し、亜硝酸型硝化処理状態（52~129 日目）の平均値は 1.9 となった。このことから、本実験においても過去の検討と同様に、34%とほぼ理論値通りのメタノール削減効果が得られることを確認した。

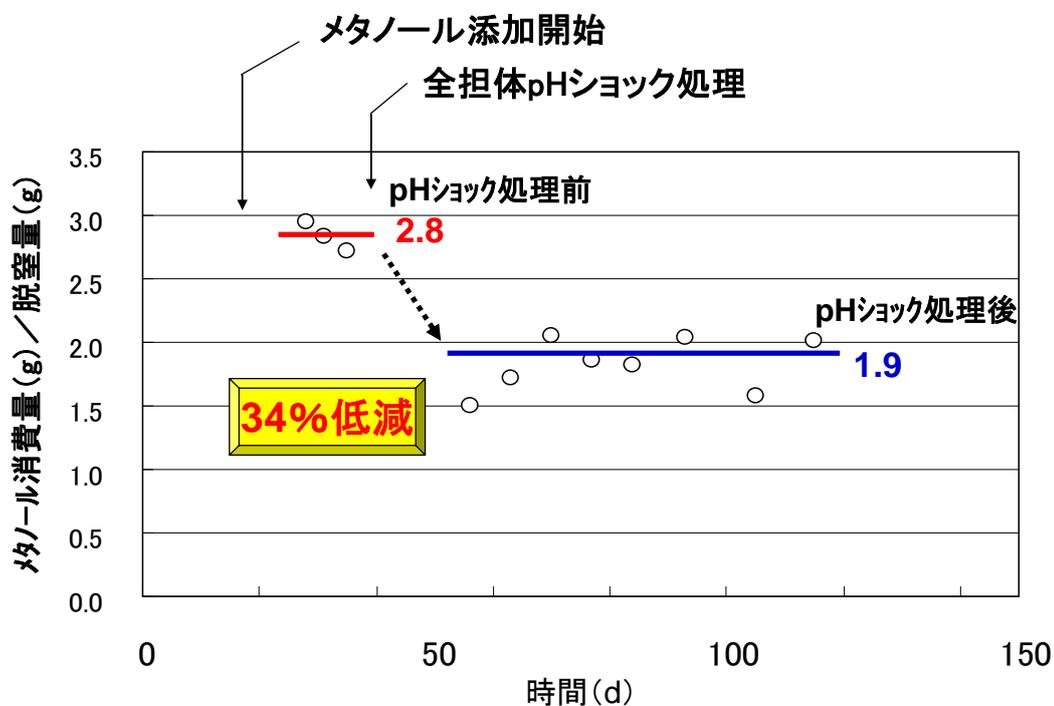


図 26 脱窒反応のメタノール/T-N 比

2) 亜硝酸型硝化に及ぼす遊離アンモニアの影響

亜硝酸酸化活性を抑制し多くの酸素供給量を削減する亜硝酸型硝化プロセスを維持する方法として、①槽内の遊離アンモニア濃度を高濃度に維持し、②酸素供給量を抑制し、③水温を高く維持する等が一般的に知られている。中でも遊離アンモニア濃度は pH、水温、そして総アンモニア濃度によって決定するため、亜硝酸酸化活性の抑制は対象廃水の水質によって決まる傾向にある。本研究では担体の pH ショック処理による NOB の活性抑制を試みているが、本法においても外部から流入する NOB の活性抑制には槽内遊離アンモニア濃度の維持が不可欠となる。

そこで、NOB 活性抑制のために必要な遊離アンモニア濃度を定量的に評価することを目的に、供給アンモニア濃度を変動した連続処理実験を行い、硝酸性性能の評価を行った。本実験に用いた連続処理装置を図 27 に示す。

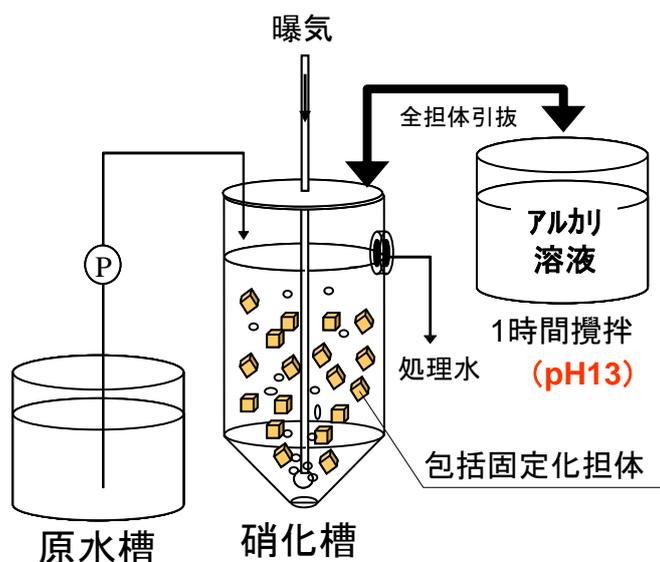


図 27 連続処理装置

硝化槽（容積 2L）を用いて $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 200mg/L の無機合成廃水を対象に連続処理を立ち上げた（Phase1）。その後、表 11 に示す工程で無機合成廃水の NH_4^+ 濃度を変更、または pH ショック処理を行い NO_2 、 NO_3 生成速度へ及ぼす遊離アンモニア濃度の影響を評価した。

その他の運転条件は、HRT7.5 h、平均水温 18°C、平均 pH8.1、平均 DO は 6.0 mg/L とした。遊離アンモニア濃度は Anthonissen¹⁾ らの計算式から算出した。

| Phase | 運転時間 (日) | 平均流入 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/L) | 備考 |
|-------|-------------|---|----------------|
| 1 | 0-12 | 200 | 立上げ期間 |
| 2 | 13-33 | 192 | — |
| 3 | 34-44 | 244 | — |
| 4 | 45-61 | 97.2 | — |
| 5 | 62-69 | 201 | — |
| 6 | 70-77 | 238 | — |
| 7 | 78-100 | 199 | 100日目にpHショック処理 |
| 8 | 101-130 | 197 | 再立上げ期間 |
| 9 | 131-270 | 194 | pHショック処理後 |

表 11 連続硝化処理条件

pH ショック処理は、硝化槽から供試担体を一度取り出し、pH13 に調整したアルカリ液へ投入して行った。担体は 20℃、80rpm の条件で 1 時間スターラ攪拌し、その後 pH 7.5 へ中和してから実験を行った。

連続処理実験の結果を図 28 に示す。硝化活性は約 2 週間で立ち上がりアンモニア除去速度は $0.34\text{kg-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ に達した (硝化率 55%)。その後、無機合成廃水の NH_4^+ 濃度を増減させ連続処理を行った。その結果、処理水中には NO_2 が蓄積するのと同時に、 NO_3 生成活性が一定量維持された。運転 100 日目には全担体を pH ショック処理すると、 NO_3 生成が完全に抑制された亜硝酸型硝化状態へと移行した。

槽内遊離アンモニア濃度と NO_3 生成速度を比較した結果を図 29 に示す。その結果、Phase1 から 2 へ移行すると、 NO_3 生成速度は平均で $0.13 \text{ kg-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ まで上昇した。その後、Phase3 へ移行すると平均 NO_3 生成速度は $0.054 \text{ kg-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{日})$ まで低下した。これは遊離アンモニア

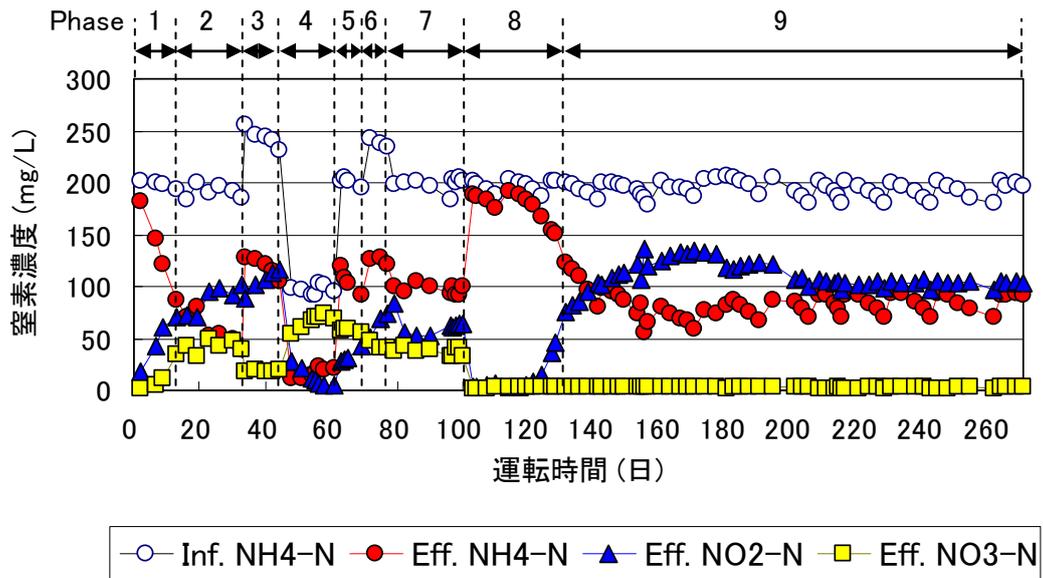


図 28 連続処理実験

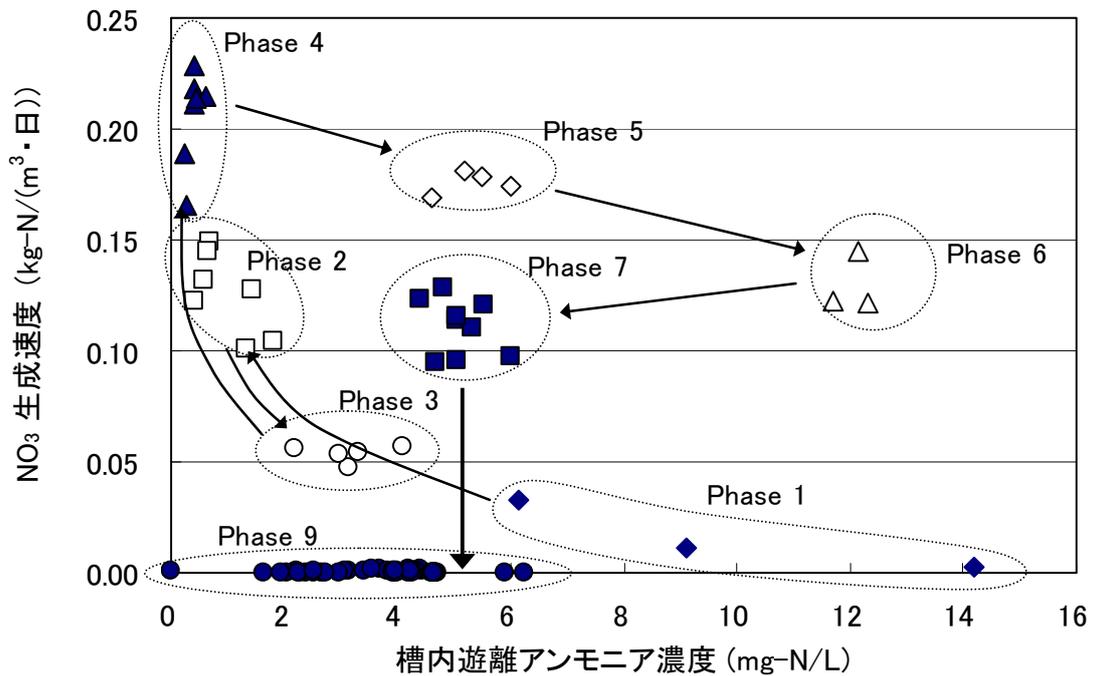


図 29 槽内遊離アンモニア濃度と NO₃ 生成速度の比較

が NOB 活性を抑制したためだと考えられた。しかしながら、その後 Phase4 を経てから Phase5, 6, 7 へ移行すると Phase3 よりも高い槽内遊離アンモニア濃度であるにもかかわらず、高い NO₃ 生成速度を示した。NO₃ 生成速度の履歴から、Phase3 と 4 において NOB 菌体密度が上昇していることが強く示唆されているため、NOB 菌体密度が一度上昇すると遊離アンモニア濃度による NO₃ 生成活性の抑制がスムーズに行われない現象が現れることが考えられた。一方、pH ショック処理後は槽内遊離アンモニア濃度にもかかわらず NO₃ 生成活性は完全に抑制されることを確認した。

3) 亜硝酸型硝化担体内細菌叢に及ぼす pH ショックの影響

「2) 亜硝酸型硝化に及ぼす遊離アンモニアの影響」において行った pH ショック処理 (pH13, 処理時間 1 時間) による担体内の細菌量の変化を評価するため、処理前後の担体内の DNA 量を測定した。結果を図 30 に示す。活性と細菌量の関係を確認するため DNA 測定時の硝化活性についても併記した。その結果、pH ショック処理直後は DNA 量が 46% まで減少し、硝化活性も低下していた。しかしながら、処理 13 日後の DNA 量は更に 27% までに減少しているものの AOB 活性

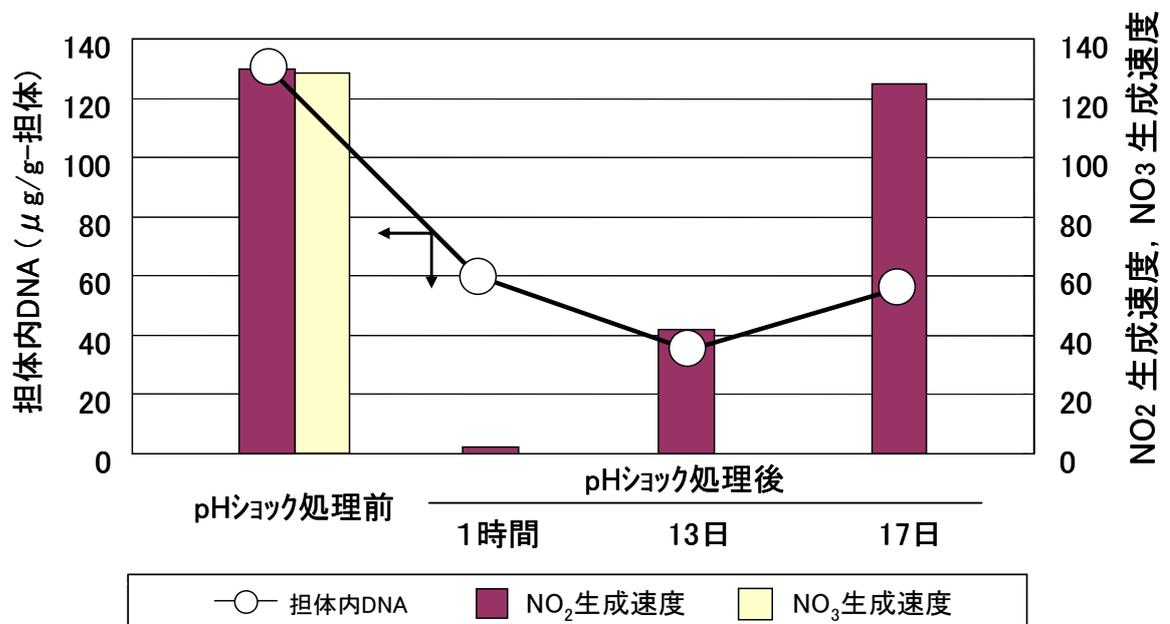


図 30 pH ショック処理による担体内 DNA 量の変化

| 細菌種名 | |
|--|-----------------------------------|
| pHショック処理前 | pHショック処理13、17日後 |
| Nitrospira sp. (NOB) | - |
| Nitrosomonas sp. (AOB) | Nitrosomonas sp. (AOB) |
| bacterium TG141 | Tuber borchii symbiont b-17BO |
| Bacteroidetes bacterium Mo-0.2plat-K3 | Pseudoxanthomonas sp. |
| estrogen-degrading bacterium KC2 | bacterium CAGY1 |
| bacterium PE03-7G4 | Rheinheimera chironomi |
| Chitinophagaceae bacterium HU1-GB11 | Stenotrophomonas maltophilia |
| bacterium Ellin5114 | Pseudomonas sp. |
| Adhaeribacter aquaticus | Flavobacterium sp. |
| Sphingobacteriales bacterium TP64 | bacterium G14 |
| Sideroxydans lithotrophicus | bacterium CYCU-0262 |
| endosymbiont of Acanthamoeba sp. KA/E9 | beta proteobacterium CDB21 |
| Sphingobacteriales bacterium TP498 | Cytophaga sp. |
| Tuber borchii symbiont b-17BO | Hyphomicrobium vulgare |
| | Simplicispira limi |
| | Sphingomonas sp. 86 |
| | bacterium RBS4-66 |
| | Rheinheimera sp. 114NP12 |
| | Methylophilus sp. u33 |
| | Acetobacter pasteurianus |
| | Acidovorax sp. |
| | Stenotrophomonas sp. IMER-B4-1 |
| | bacterium rJ10 |
| | Xanthomonas sp. XXL-1 |
| | Stenotrophomonas sp. T116 |
| | Flavobacterium aquatile |
| | Methylobacillus flagellatus |
| | Acinetobacter johnsonii |
| | rhizosphere soil bacterium RSI-24 |
| | Fluviicola taffensis |
| | Stenotrophomonas rhizophila |
| | Hydrogenophaga sp. |
| | Stenotrophomonas sp. FB206 |

表 12 担体内細菌種名リスト

は上昇し、17 日後の DNA 量は 57%程度なのにも関わらず、pH ショック処理前とほぼ同等の AOB 活性 (127mg-N/L-担体・h) までに回復した。なお、pH ショック処理後の NOB 活性は完全に消失した。pH ショック処理により担体内 DNA 量が著しく低下しているにもかかわらず、高い AOB 活性が示され、この原因を探索するため、担体内細菌の DNA クローン解析により細菌種を特定した。解析した細菌種名のリストを表 12 に示す。

得られた細菌種リストから AOB は *Nitrosomonas* 属で, NOB は *Nitrospira* 属で構成されていた。そこで, 得られたクローン数から, AOB および NOB の pH ショック前後における相対量変化を解析した。得られた結果を図 31 へ示す。その結果, pH ショック処理 1 時間後, NOB の DNA は 92% 残存していたが, 13 日後には完全に消失していた。NOB は pH ショック処理直後にはほぼ死滅し, その直後は DNA のみが担体内に残留していたものとする。AOB は pH ショック処理後に 29% まで減少したものの, 17 日後に 54% にまで回復していた。この結果から, 担体内へ優占している NOB は pH ショック処理によって死滅し DNA を消失する一方, AOB の一部は生存し続け, 亜硝酸型硝化が維持されていることが明らかとなった。

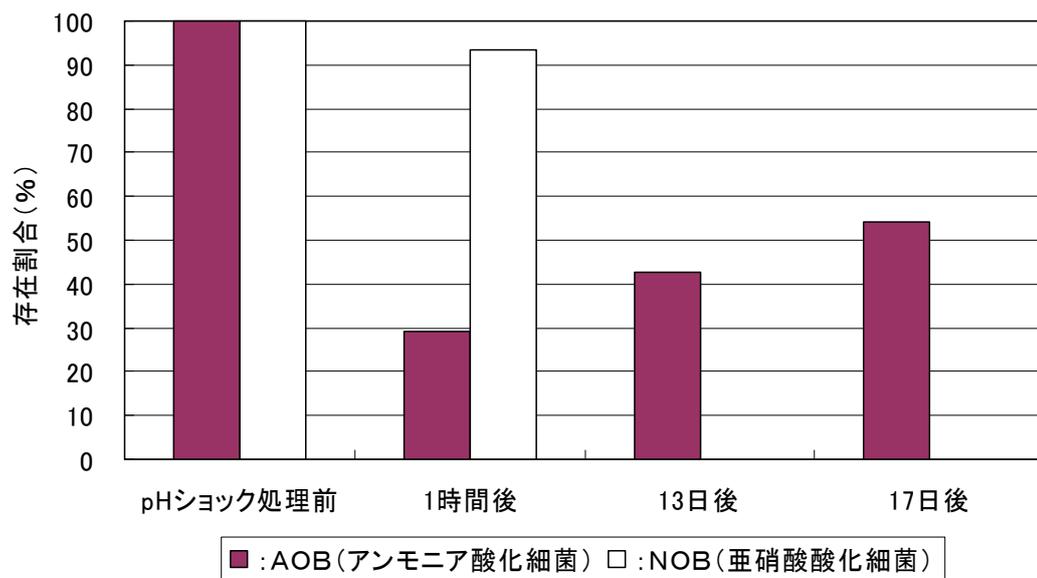


図 31 担体内の硝化細菌へ及ぼす pH ショック処理の影響

4) 消化汚泥脱水ろ液の連続亜硝酸型硝化処理

消化汚泥脱水ろ液を対象排水とし、亜硝酸型硝化処理装置による連続処理運転の立上げを行った。また、アルカリショック処理技術の適用条件として、アンモニア濃度について検討した。

1. 消化汚泥脱水ろ液

処理対象である消化汚泥脱水ろ液は、横浜市北部汚泥資源化センターよりご提供いただき、消化汚泥を遠心脱水工程後段から採取した。採取後、横浜市から一体処理型排水処理設備の設置場所である千葉県松戸市まで輸送し、原水冷却装置内にて冷蔵保存（10℃）し連続処理試験へ使用した。表 13 に採取した消化汚泥脱水ろ液の平均水質（2010 年 12 月～2011 年 3 月；n=4）を示す。一般に亜硝酸型硝化にはアンモニア濃度が高く、有機物濃度が低い水質の廃水が適していることが知られているが、平均アンモニア性窒素濃度（NH₄-N）は 1,000mg/L と高く、有機物由来の生物学的酸素要求量（C-BOD）は 33mg/L と低く、C-BOD /N 比が 0.033 と極めて低いことから本研究へ適した水質であることを確認した。

| 測定項目 | 平均濃度(mg/L) |
|------------------------------|------------|
| 懸濁物質(SS) | 48 |
| 生物学的酸素要求量(BOD) | 41 |
| 溶解性BOD | 28 |
| C-BOD | 33 |
| 化学的酸素要求量(COD _{Mn}) | 120 |
| 溶解性COD _{Mn} | 100 |
| ケルダール窒素(Kj-N) | 1,000 |
| アンモニア性窒素(NH ₄ -N) | 1,000 |
| 亜硝酸性窒素(NO ₂ -N) | 0 |
| 硝酸性窒素(NO ₃ -N) | 0 |
| 全りん(T-P) | 60 |
| リン酸態リン(PO ₄ -P) | 59 |

表 13 消化汚泥脱水ろ液の平均水質

2. 消化汚泥脱水ろ液の亜硝酸型硝化の検討

試作した一体処理型排水処理設備を図 32 に示す。硝化槽（100L）を 2 系を配置し、担体引抜アルカリ処理装置を反応槽上部に設置している。



図 32 一体処理型排水処理設備

各種運転条件を表 14 に、硝化率制御概念図を図 33 に示す。後段のアナモックス反応の窒素反応比率 NO_2/NH_4 は 1.3 であることから、前段処理である亜硝酸型硝化反応の硝化率は 57% を安定維持する必要がある。

| 項目 | 条件 |
|--------------|---------|
| 水理的滞留時間(HRT) | 19～24時間 |
| 担体アルカリ処理 | 無し |
| 反応有効容積 | 100L |
| 担体充填率 | 10V/V% |
| 攪拌方法 | エアリフト方式 |
| 水温 | 30°C |
| pH | 7.5 |

表 14 各種運転条件

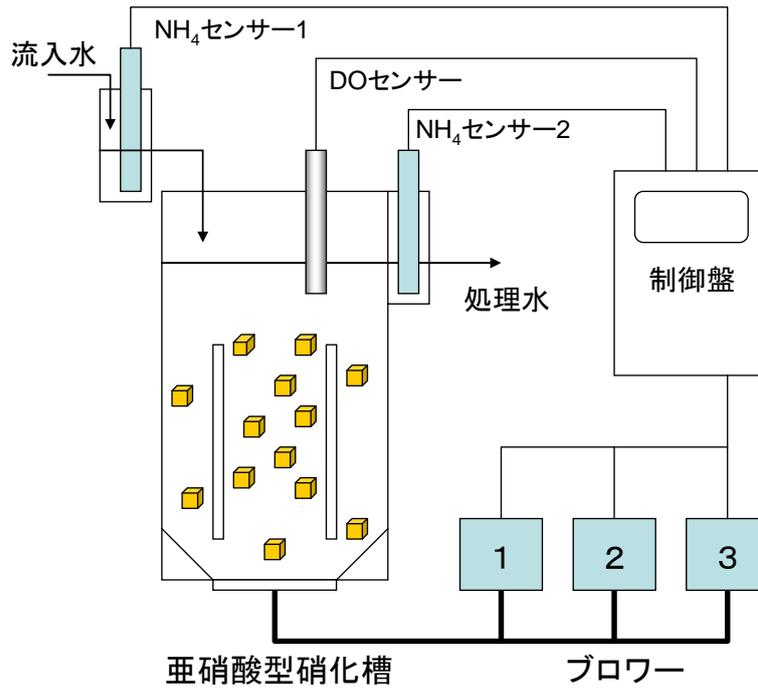


図 33 硝化率制御概念図

硝化率は 1) 式で求められる。

$$\text{硝化率} = \left(1 - \frac{\text{処理水NH}_4\text{-N}}{\text{流入水NH}_4\text{-N}} \right) \times 100 \quad \text{----- 1)}$$

本装置では NH₄ センサ 1, 2 の値から硝化率を算出し、硝化率が 56%未満であるときは溶存酸素 (DO) 濃度を 4.0mg/L に、56%以上57%以下では DO2.0mg/L に、57%よりも高いときは DO1.0mg/L になるよう、運転するブローワー台数を自動調節した。

得られた結果を図 34 に示す。硝化活性は約 10 日間で立ち上がり、亜硝酸生成速度は最大 0.79kg-N/(m³・日)まで上昇した。運転期間 350 日において、硝酸の生成は確認されず良好な亜硝酸型硝化を維持することができた。また、硝化率は 50~65%で制御され概ね安定した運転処理性能を確認した。残留アンモニア濃度が高く、良好な硝酸生成活性の抑制ができたものと考えられた。

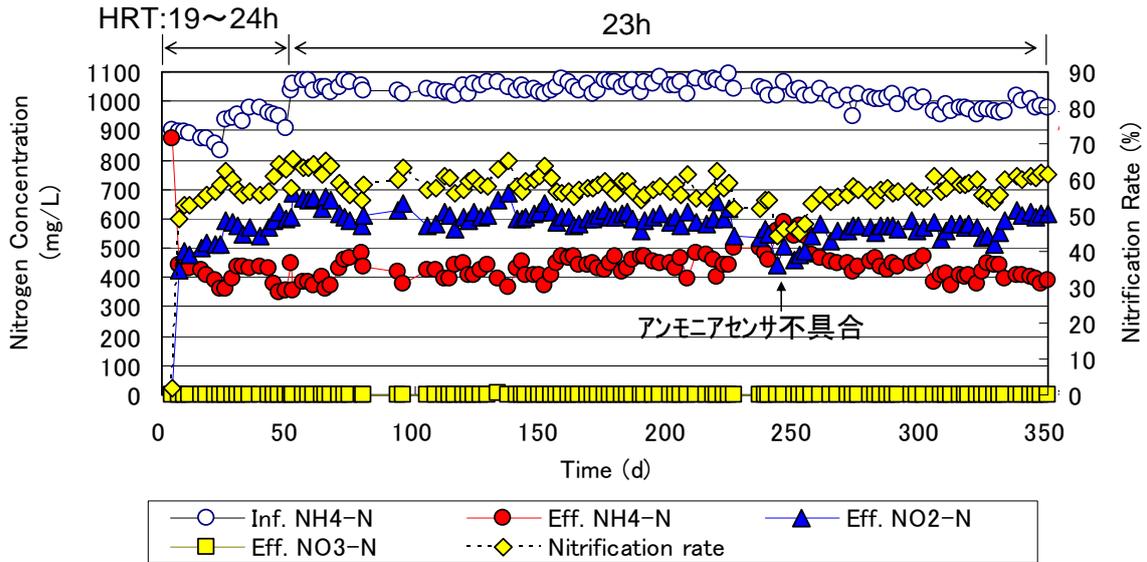


図 34 亜硝酸型硝化連続処理運転（消化汚泥脱水ろ液）

消化汚泥脱水ろ液はアンモニア濃度が極めて高いため、反応槽内に十分な遊離アンモニア濃度が確保できることから、pH ショック無しでも十分な硝酸生成活性の抑制が可能であることが実証された。よって、次に亜硝酸型硝化が可能な対象廃水のアンモニア濃度の検証について行うこととした。

3. 消化汚泥脱水ろ液希釈液の亜硝酸型硝化

図 33 に示す硝化槽と同型装置で硝化率制御を行わない実験系を用いて亜硝酸型硝化試験を行った。消化汚泥脱水ろ液を水道水で 5 倍希釈し硝化槽へ投入した。水温は 20°C で制御した。それ以外の条件は、上記亜硝酸型硝化連続処理運転と同等とした。実験結果を図 35 に示す。

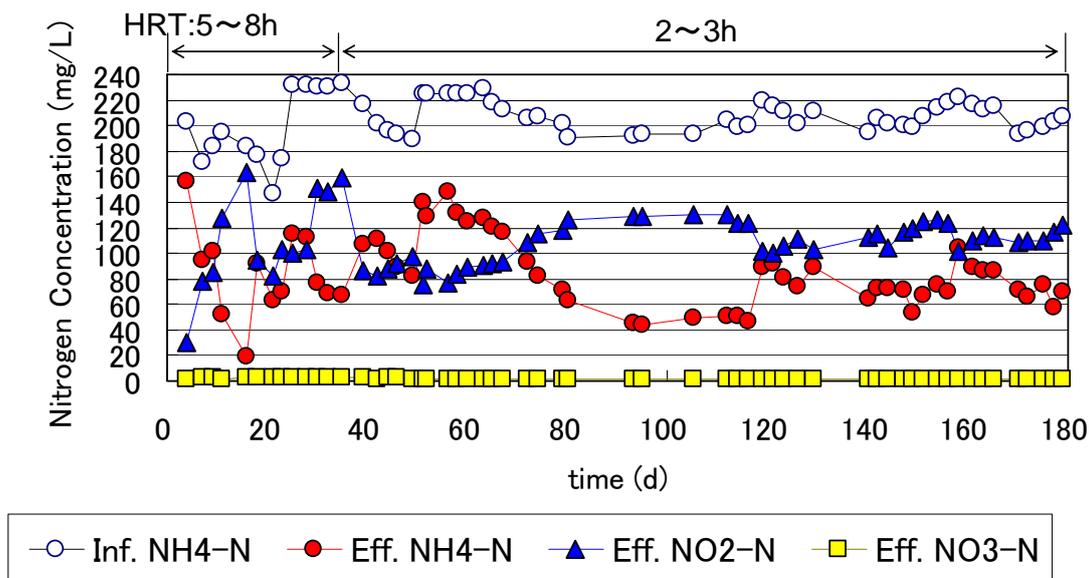


図 35 亜硝酸型硝化連続処理運転（消化汚泥脱水ろ液 5 倍希釈）

その結果、硝化活性は約 2 週間で立ち上がり、その後約 165 日間に渡り安定した亜硝酸型硝化を実現した。硝酸の生成は全く確認されず、担体の pH ショックを行う必要はなかった。

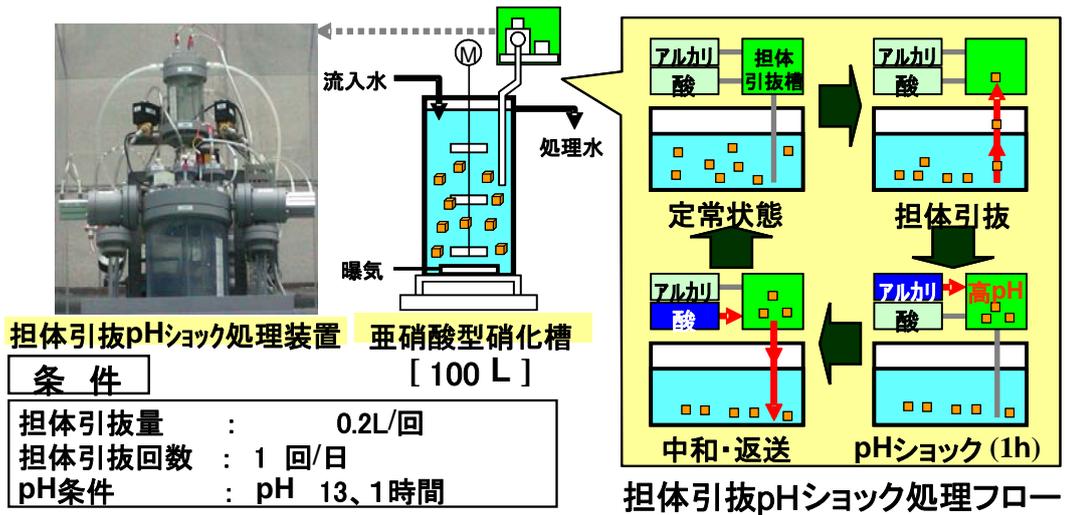


図 36 担体引抜き pH ショック装置の概念図

次に、原水 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が 80mg/L になるよう、消化汚泥脱水ろ液を更に水道水で希釈し反応槽へ投

入し、水温 20°C の条件で連続処理実験を行った。本実験では硝酸生成が予想されたことから硝化率制御を行わない図 33 に示す硝化槽の上部に担体引抜き装置を設置して連続処理実験を行った。図 36 に担体引抜き pH ショック装置の概念図を示す。担体の引抜き量は硝化槽充填担体の 2% とし、処理頻度は 1 日 1 回とした。pH13 の条件で 1 時間処理し、中和後硝化槽へ返送した。

得られた結果を図 37 に示す。

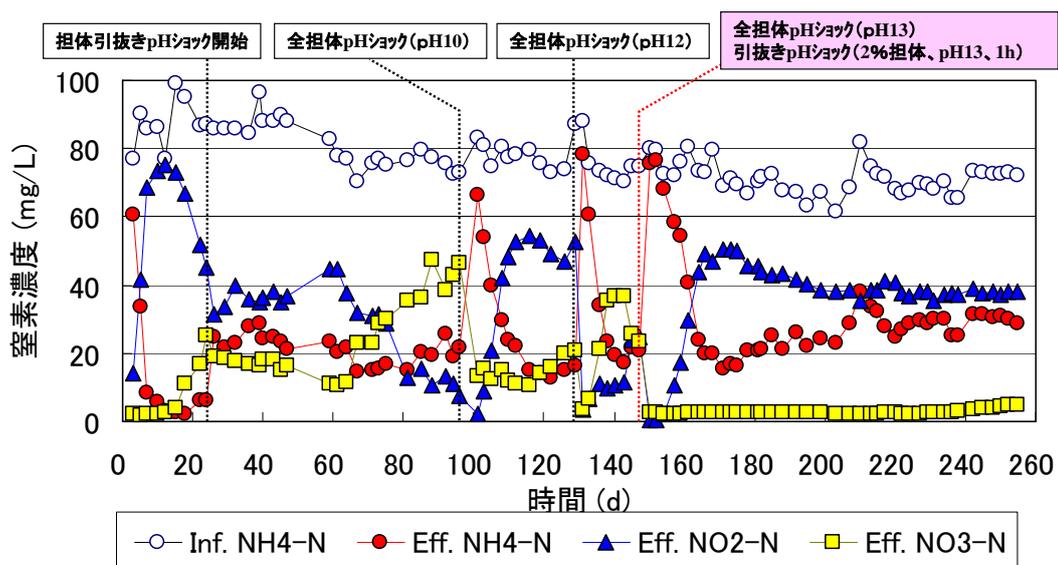


図 37 亜硝酸型硝化連続処理運転（消化汚泥脱水ろ液 12.5 倍希釈）

硝化活性は約 1 週間で立ち上がり、すぐに NO_3 生成が活性化したため、担体引抜き pH ショックを開始した。しかしながら NO_3 生成活性は抑制されたものの完全ではなかったため、全担体を引き抜いて pH10、pH12 の条件で、それぞれ 1 時間 pH ショック処理を行ったものの NO_3 生成活性を抑制するにはいたらなかった。そこで、運転 147 日目に全担体を引き抜いて pH13 の条件で 1 時間 pH ショック処理を行い、その後担体引抜き pH ショック処理を継続させたところ、ようやく NO_3 生成活性の抑制に成功した。約 90 日間の亜硝酸型硝化を安定することに成功し、低濃度アンモニア廃水でも pH ショック法により亜硝酸型硝化が十分可能であることを示すことに成功した。

2. 1. 6 亜硝酸型硝化における亜酸化窒素発生抑制

亜硝酸型硝化では、アンモニアの酸化を亜硝酸の段階で留め、硝酸への酸化を抑制することで酸素消費を削減する。しかしながら、亜硝酸蓄積により温室効果ガスの一つである亜酸化窒素 (N_2O) の発生が多くなるため、 N_2O の発生抑制が課題とされている。本研究では、合成廃水の硝化処理における pH ショック法による $\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4$ 転換率（除去された NH_4 の内 N_2O へ転換した割合）の変化と曝気風量の影響を解析し、また、pH ショック法による AOB の群集構成変化を検討した。さらに、実廃水の硝化処理における pH ショック法による $\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4$ 転換率の変化と槽内窒素濃度、有機物濃度の影響を解析した。さらに、硝化処理槽内の N_2O 発生メカニズム特定の手法開発に向けて、窒素の各種安定同位体から生成される N_2O を解析した。

1) ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-QMS) を用いたガス迅速測定法の開発

GC-QMS (GCMS-QP2010Plus, 島津製作所) を用い、高感度で一度に多種類のガスを測定する方法を開発した。特に大気の混入がないように GC-QMS システムの注入口と排出口を工夫した。さらに、これを応用してテドラーバッグからのガス採取方法と GC-QMS へのガス試料の注入方法を

改変し、以下の N_2O 分析にはこのシステムを用いた。

大気の混入がないように改変した GC-QMS システムの概略図を図 1 に示す。インジェクションポートを He ガスで囲み (図 38)、さらに He ガスで針先を洗浄したガスタイトシリンジを用いて He ガス内でガス試料を採取することによって大気の混入を防いだ。その結果、図 39 に示したように、試料中に混在する気体分子を分離して、それぞれを一度に感度高く検出することができた。

本方法をテドラーバッグ内のガス試料の採取にも応用した (図 40)。テドラーバッグのガス採取口にシリコンチューブとセプタムを取り付けて He ガスを流し (図 40a)、ガスタイトシリンジで採取したガスは He ガスで囲んだ GC-QMS セプタムインジェクションポートに注入することによって (図 40b) 低濃度の N_2O を検出した。

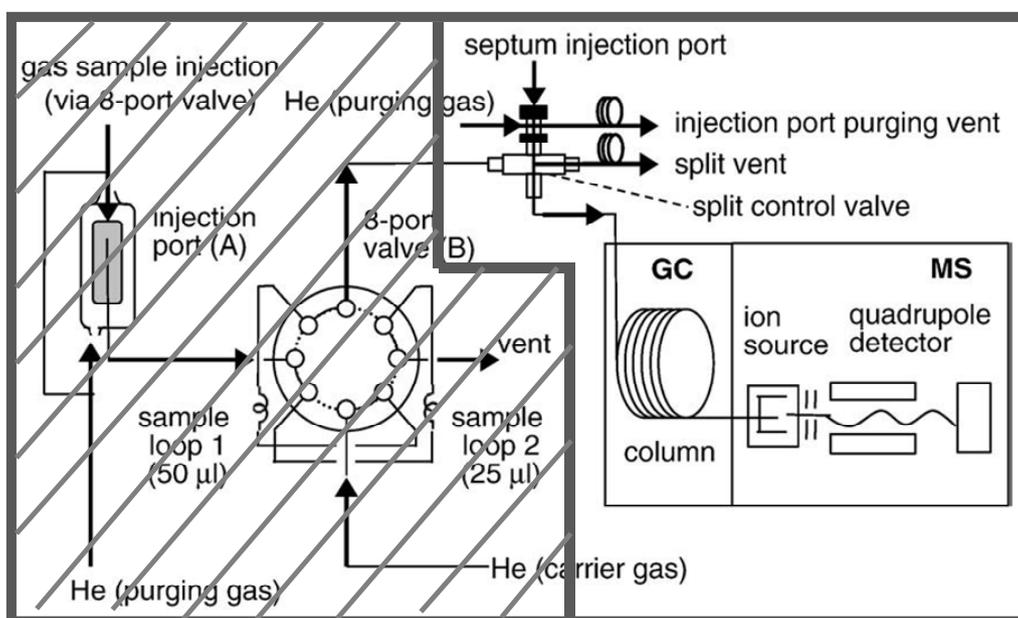


図 38 本研究で開発した GC-QMS システムの概略図 (Isobe et al. 2011 より抜粋)。今回の N_2O 分析においては斜線部を除くガス流路を使用した。

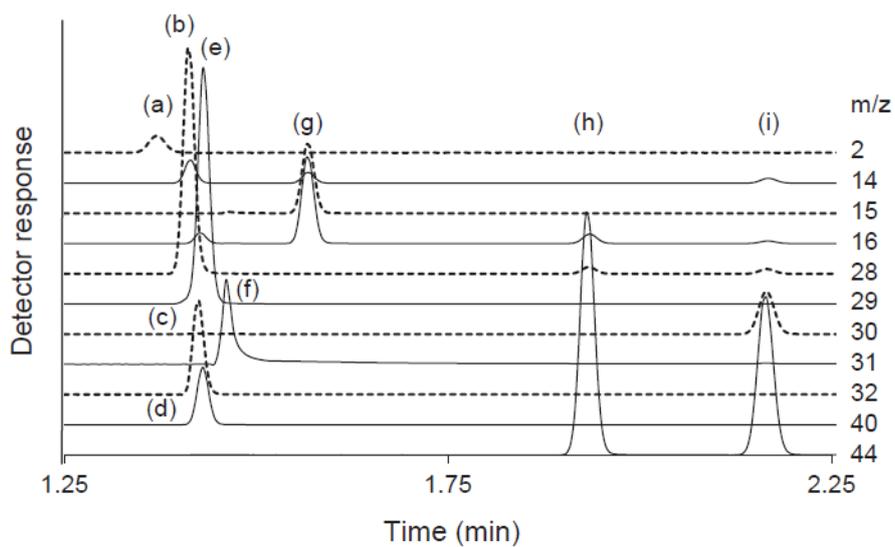


図39 9種類のガスのマスクロマトグラム (Isobe et al. 2011より抜粋) . Heガス中の H_2 (a, m/z 2), N_2 (b, m/z 14, 28), O_2 (c, m/z 16, 32), Ar (d, m/z 40), ^{13}CO (e, m/z 29), ^{15}NO (f, m/z 31), CH_4 (g, m/z 15, 16), CO_2 (h, m/z 28, 44), N_2O (i, m/z 30, 44).

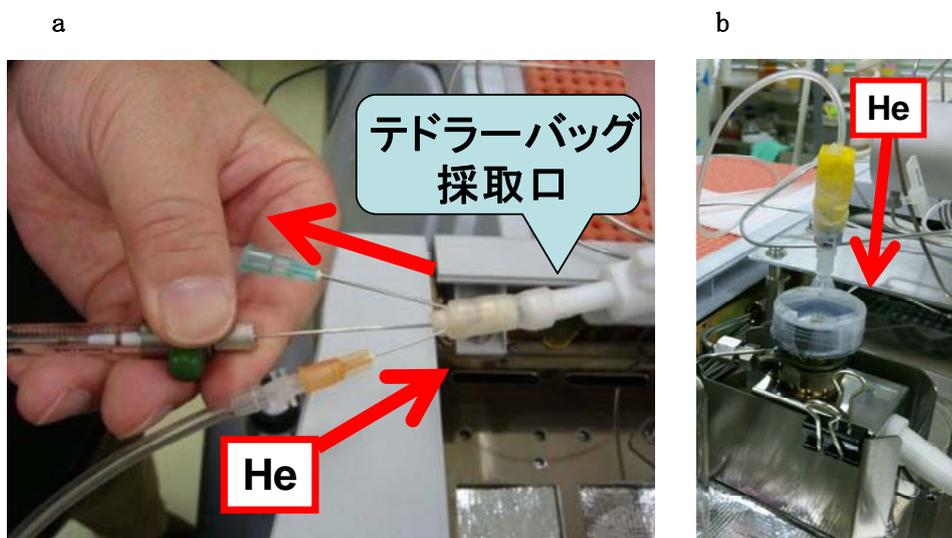


図40 テドラーバッグからのガス採取方法 (a) と GC-QMS インジェクションポートの周囲をHeガスで囲む様子 (b) .

2) 廃水の連続硝化処理と槽内ガスの採取（合成廃水処理）

NH₄-N 濃度を約 200 mg/L に調整した硫酸アンモニウムを主成分とする無機合成廃水を連続処理装置への流入水として使用した。反応容積 2 L の硝化槽を用いて無機合成廃水を連続処理した後、pH ショック（活性汚泥の固定化担体を pH 13 に 1 h 曝露）を行い再び連続運転を行った。定常運転条件は水温 17～18℃、HRT 7.5 h, pH 8, 曝気風量は 1.0 L/min・L-槽（DO 約 6 mg/L）とした。pH ショック前後の槽内の N₂O ガス分析のために、一時的に硝化槽を密閉し、槽上部とテドラーバッグを直結し漏出するガスを採取した。また、曝気風量の N₂O/NH₄ 転換率への影響を調べるため、pH ショック後の硝化活性が安定するのを確認し、風量を 0.40, 0.70, 1.0, 1.3, 4.0 L/min・L-槽へ変化させ、それぞれ風量変更 24 時間後の水質と排出ガスの分析を行った。

亜酸化窒素の発生量は、酸化されたアンモニア性窒素のうちどれだけが亜酸化窒素へ転換されたか、N₂O/NH₄ 転換率として算出した。1) 式に示す

$$\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{転換率}(\%) = \frac{(\text{発生N}_2\text{O-N量})}{(\text{流入NH}_4\text{-N量} - \text{残留NH}_4\text{-N量})} \times 100 \quad \dots\dots\dots 1)$$

合成廃水処理の pH ショック前後の硝化槽における N₂O/NH₄ 転換率の変化を図 41 に示す。pH ショック前の N₂O/NH₄ 転換率は 2.3～3.1%であったが、pH ショック直後に 0.15%以下まで低下し、AOB 活性が回復した後も pH ショック前よりも低い 0.88～1.4%を示した。また、運転 147 日目以降において、曝気風量を増減させ N₂O/NH₄ 転換率の変化を解析したが明確な相関は得られなかった（図 42）。よって、本実験条件においては、曝気風量にかかわらず pH ショック後の硝化反応で N₂O/NH₄ 転換率は低下し、N₂O 生成に係わる機構が pH ショックにより抑制されていることが示唆された。

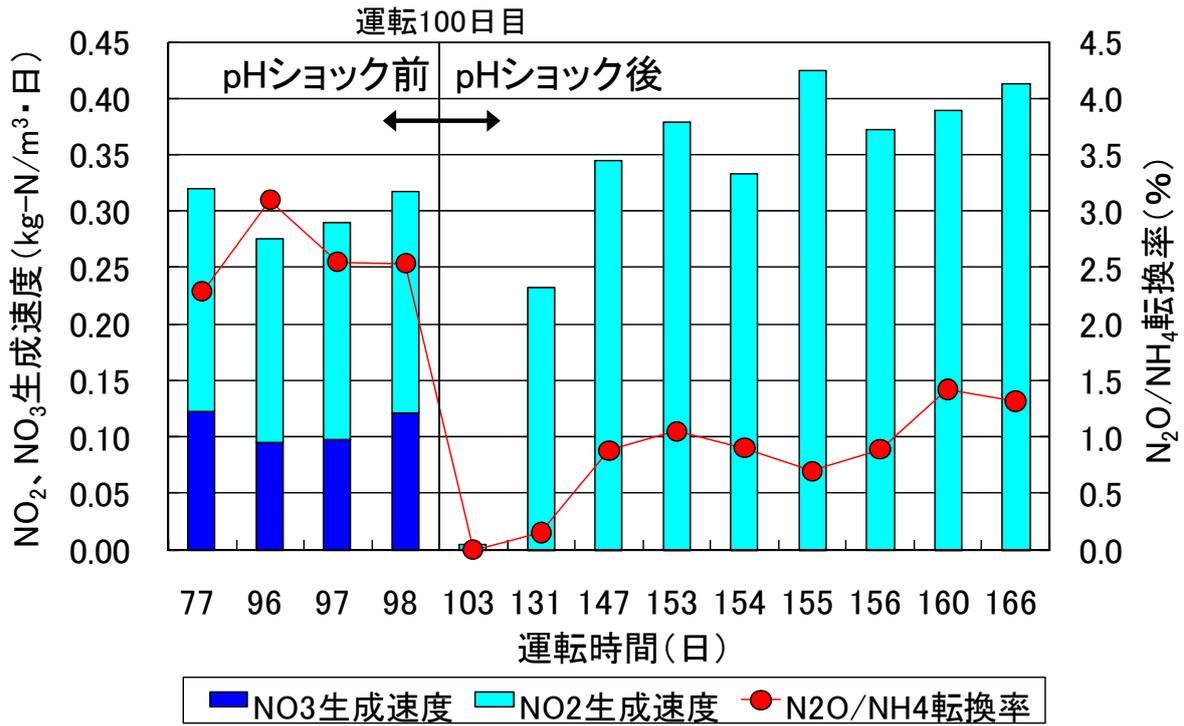


図 41 合成廃水処理槽における NO₂, NO₃ 生成速度と N₂O/NH₄ 転換率の変化

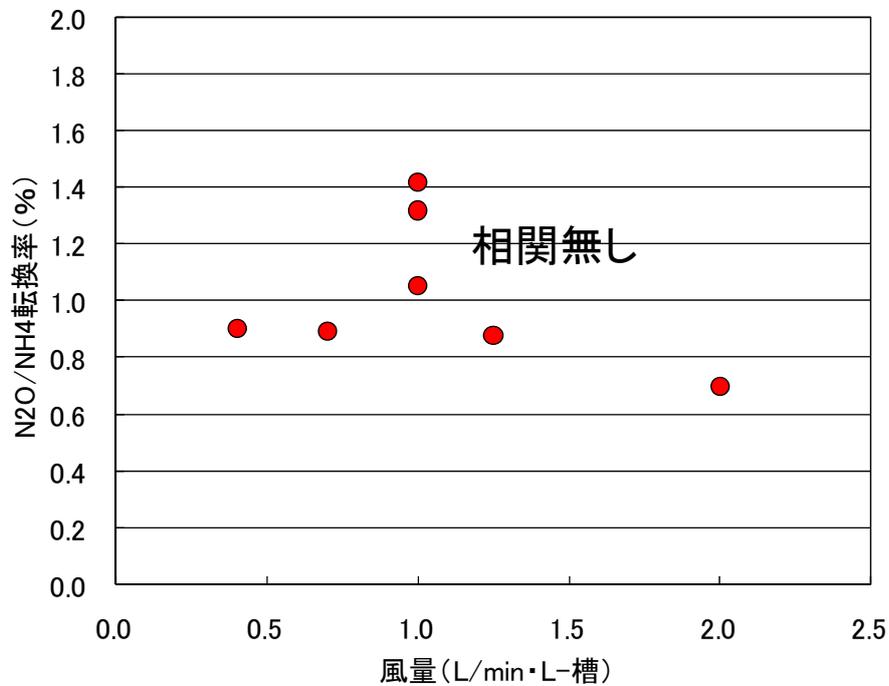


図 42 合成廃水処理における曝気風量の違いによる N₂O/NH₄ 転換率

3) 廃水の連続硝化処理と槽内ガスの採取（実廃水処理）

横浜市北部汚泥資源化センターの消化汚泥脱水ろ液の原液（ $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 1,000 mg/L）および希釈液（ $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 80 mg/L；原液を水道水で希釈）をそれぞれ連続処理装置への流入水として使用した。反応容積 100 L の硝化槽 2 系を用いて連続運転を行った。原液系は水温 30°C，HRT 23 h，pH7.5 とした。希釈液系は 20°C，HRT 3 h，pH7.5 とした。原液系は硝化槽へ設置したアンモニアセンサーを用い曝気風量を調節することで硝化率が 57% になるよう制御した。pH ショック前後の槽内の N_2O ガス分析のために、一時的に硝化槽を密閉し、槽上部とテドラーバッグを直結し漏出するガスを採取した。

実廃水処理（原液： $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 1,000 mg/L）の pH ショック前後の硝化槽における $\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4$ 転換率の変化を図 43 に示す。

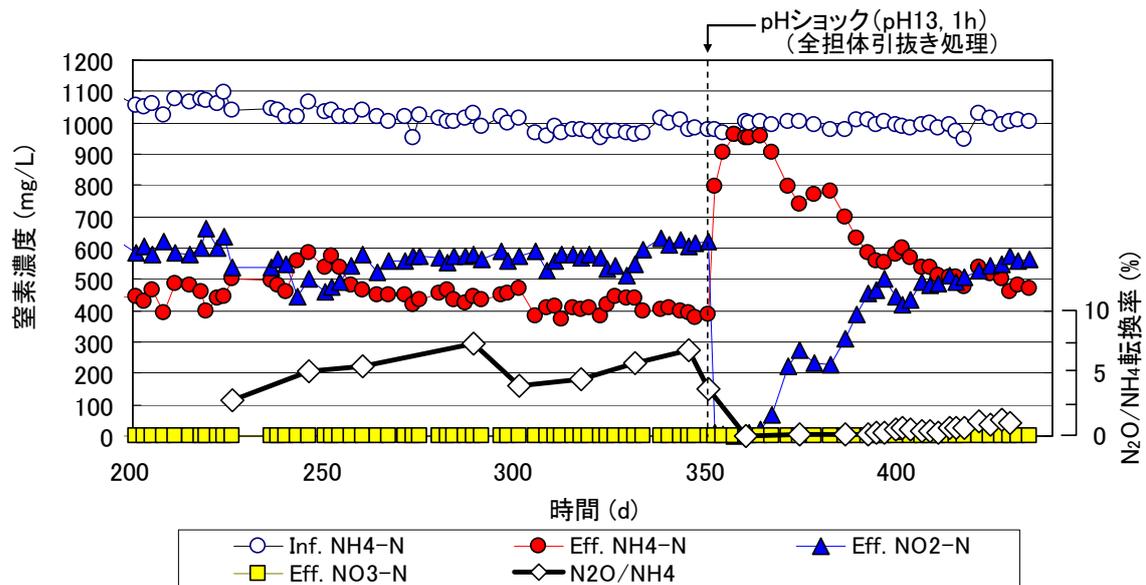


図 43 実廃水処理槽（原液： $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 1,000 mg/L）における各態窒素濃度と $\text{N}_2\text{O}/\text{NH}_4$ 転換率の経日変化

亜硝酸型硝化が約1年に渡って安定することを確認したが、運転226～350日目での平均 N_2O/NH_4 転換率は5.1%と高い値を示した。そこで槽内全担体をpHショック(pH13, 1h)処理した結果、 N_2O/NH_4 転換率がショック後に約0.3%に抑えられた。実廃水処理(希釈液： NH_4-N 約80 mg/L)での結果を図44に示す。pHショック(pH13, 1h)によりショック前に0.4～1.5%の N_2O/NH_4 転換率がショック後に0.2%以下に抑えられた。

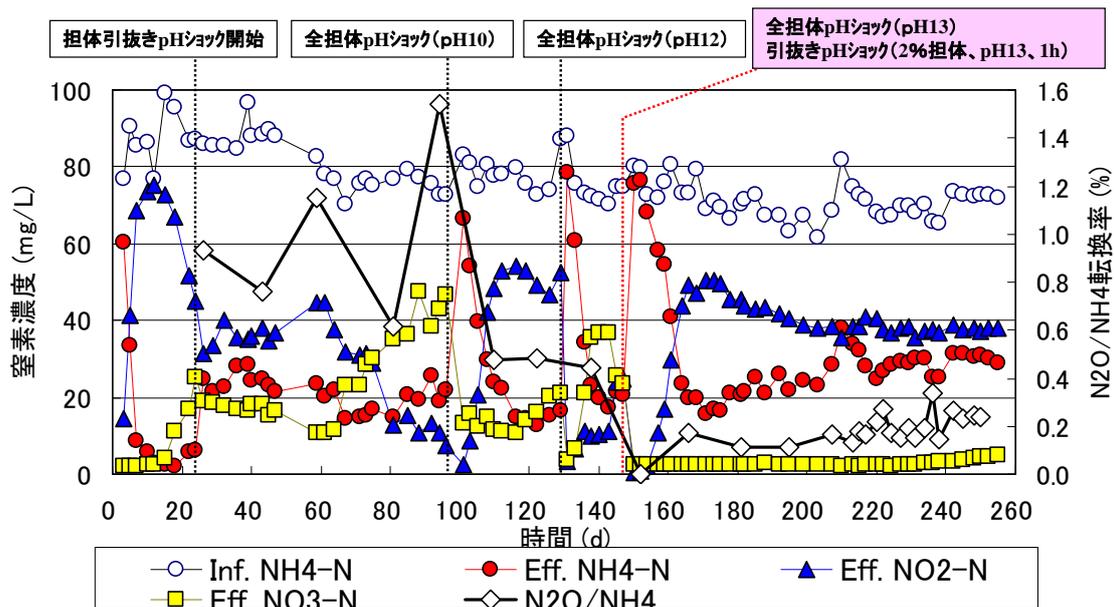


図44 実廃水処理槽(原液： NH_4-N 約80 mg/L)における各態窒素濃度と N_2O/NH_4 転換率の経日変化

各態窒素および炭素濃度と N_2O/NH_4 転換率の関係を図45に示す。その結果、pHショック前の槽内 NH_4-N 濃度、 NO_2-N 濃度、無機炭素(IC)濃度および全炭素(TOC)濃度と N_2O/NH_4 転換率との間に相関がみられた。 NO_3-N 濃度と N_2O/NH_4 転換率には相関がみられなかった。pHショック前はこれらの窒素濃度や炭素濃度のいずれかが、 N_2O/NH_4 転換率に影響を与えたと考えられる。ICが高いと硝化が促進され、 N_2O/NH_4 転換率は低いと予想されたがそうではなかった。また、希釈系処理槽では NO_3-N 濃度が高いほど硝化が進んでいると考えられるため、 NO_3-N

濃度が高いときは N_2O/NH_4 転換率が低いと予想されたが、希釈系処理槽では NO_3-N 濃度に対し、 N_2O/NH_4 転換率は横ばいであった。一方、pH ショック後には槽内窒素濃度および炭素濃度にかかわらず、 N_2O/NH_4 転換率は低減された。以上より、pH ショックを行わずに亜硝酸型硝化が安定している場合においても、pH ショックを与えることによって N_2O/NH_4 転換率の低減に一定の効果があることが示された

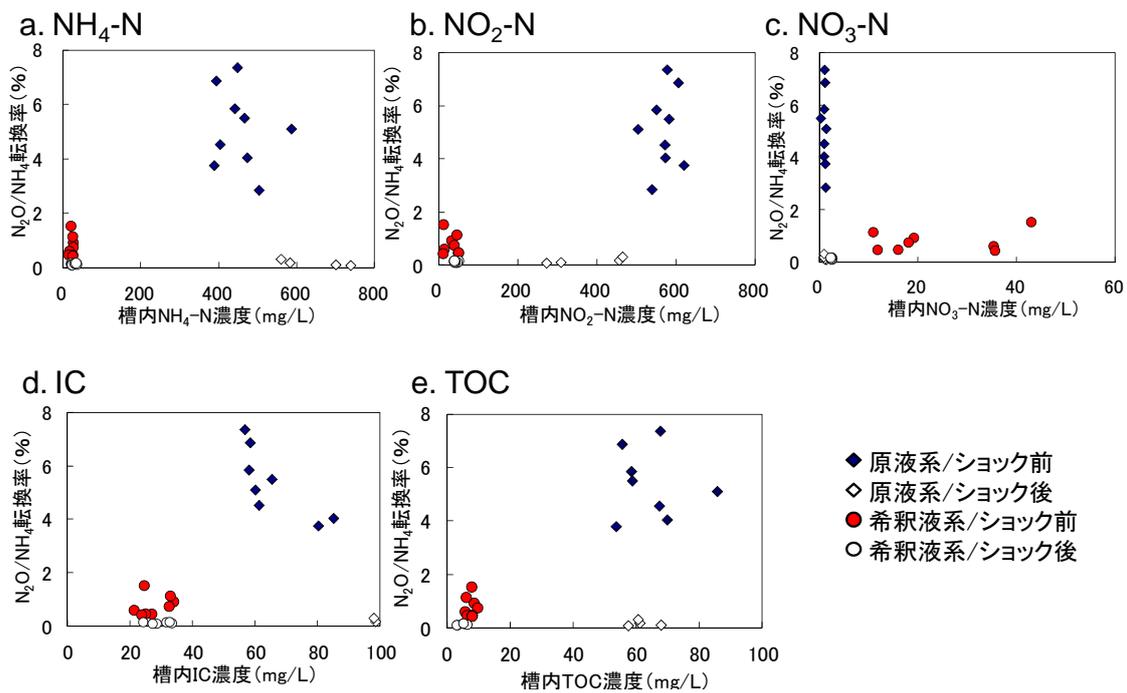


図 45 実廃水処理（原液： NH_4-N 約 1,000 mg/L）の pH ショック前後の槽内窒素および炭素濃度と N_2O/NH_4 転換率の関係。 NH_4-N 濃度 (a)、 NO_2-N 濃度 (b)、 NO_3-N 濃度 (c)、無機炭素 (IC) 濃度 (d)、全有機炭素 (TOC) 濃度 (e) と N_2O/NH_4 転換率の関係

4) pH ショック前後のアンモニア酸化細菌 (AOB) とアーキアの群集構成解析

細菌群集構成解析には、合成廃水処理における pH ショック前 (2010 年 11 月 12 日) と pH ショック後 (2010 年 12 月 17 日) の試料を用いた。AOB の解析には β -プロテオバクテリアの 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR プライマーペア CT0189fABC-CT0654r (Kowalchuk et al. AEM 1997, 63: 1489-1497) を用いた。より広範囲の AOB を検出するため、アニーリング温度は 55°C に加えて 45°C においても同様に解析した。アーキアの解析には報告されているアーキアの 16S rRNA 遺伝子あるいはバクテリアおよびアーキアの 16S rRNA 遺伝子を対象としたプライマーを組み合わせ、18 組のプライマーペアを試験した。18 組のうち目的断片長の増幅がみられた 5 組の PCR 産物についてクローニング-シーケンシング解析を行った (表 15)。

PCR 増幅産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。目的以外の増幅断片がみられる場合はアガロースゲルから抽出および精製した。精製した PCR 産物を TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) を用いてクローニングし、*Escherichia coli* One shot Top10 Competent Cell (Invitrogen) に形質転換した。得られた大腸菌クローンライブラリに対して目的の長さのインサートがプラスミドに組み込まれているか PCR によりインサートチェックを行った。インサートの DNA 塩基配列は外注分析 (株式会社ファスマック) により決定した。

| | | Reverse primer | | | | | |
|----------------|---------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | Arc915r | Arc1059r | UA1204R | UA1406R | Univ907r | Univ1492r |
| Forward | Arc21F | - | - | - | - | - | - |
| primer | Arc109F | +M* | - | - | +M* | + | + |
| | Arc787f | not tested | not tested | not tested | not tested | +M | +M |
| | A571F | not tested | not tested | - | - | not tested | not tested |
| | A751F | not tested | not tested | - | +M* | not tested | not tested |

表 15 アーキア 16S rRNA 遺伝子増幅のためのプライマーの組み合わせ

＋：目的断片長の増幅産物がシングルバンドとして検出された。

－：目的断片長の増幅産物が検出されなかった。

+M：目的断片長の増幅産物が検出されたが、非特異的な増幅による産物が混在した。

*：本研究で使用したプライマーペア。

RDP Classifier に基づく pH ショック前後の AOB 構成の結果を表 16 に示す。アニーリング温度の違い（45℃、55℃）による大きな構成の違いはみられなかった。pH ショック前後とも廃水処理系でよくみられる *Nitrosomonas europaea* に近縁な種が優占し、これらの菌株が pH ショック後に生残したことが示唆された。アーキアの群集構成では、シーケンス解析の結果増幅産物は細菌の 16S RNA 遺伝子が増幅したものであり、アーキアに相同な配列は検出されなかった。また、これらの細菌の配列には、*Proteobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Chloroflexi*

門、*Nitrospira* 門をはじめとする多様な分類群の配列が含まれた。よって、アンモニア酸化アーキア (AOA) を含むアーキアの合成廃水硝化処理槽内の存在量は、バクテリアと比較して低いと考えられる。実廃水処理 (希釈液: $\text{NH}_4\text{-N}$ 約 80 mg/L) のように流入 $\text{NH}_4\text{-N}$ が低い系においてどのような AOB が優占し、どのような AOB が pH ショック後に生残するのかは、今後の課題である。

| 近縁種 | アニーリング温度 45°C | | アニーリング温度 55°C | |
|--|------------------|----|------------------|----|
| | 前 | 後 | 前 | 後 |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> strain ATCC 25978 | 90 | 94 | 88 | 96 |
| <i>Nitrosomonas oligotropha</i> | 2 | 0 | 2 | 0 |
| <i>Nitrosomonas</i> sp. Nm59 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| 合計解析クローン数 | 94 | 94 | 91 | 96 |

表 16 合成廃水処理の pH ショック前後の AOB 構成クローン数

5) N_2O 発生メカニズム特定に向けた安定同位体トレーサー法の検討

廃水硝化処理槽内の N_2O 発生メカニズムとしては、AOB によるアンモニア酸化過程、AOB による脱窒 (硝化菌脱窒) 過程、脱窒菌による脱窒過程、化学的変換が主な発生源として考えられる。このメカニズム特定の手法開発に向けて、安定同位体トレーサーを用いた AOB 純粋分離株 (富栄養性 *Nitrosomonas* sp. GH22 株、貧栄養性 *Nitrosomonas* sp. AL212 株) の培養と生成 N_2O の GC-QMS 分析を行った。 NH_4Cl および NaNO_2 の各種同位体試薬を培地に添加し (終濃度 $\text{NH}_4\text{-N}$ 84 mg/L、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 15 mg/L)、AOB 懸濁培地をバイアル瓶に封入して好気条件でバッチ培養した。バイアル瓶のヘッドスペースガスを経時的に GC-QMS 分析し、生成される N_2O を解析した。さらに、アンモニア酸化の中間代謝産物であるヒドロキシルアミン (NH_2OH) と NO_2 から N_2O が生成されることが知られているため、その化学的な生成のポテンシャルを調べるために、 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ と NaNO_2 の各種同位体 ($^{14}\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ と $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ 各終濃度 14 mg-N/L) を無菌培地に添加してバイアル瓶に封入し、好気および嫌気条件においてバイアル瓶のヘッドスペースに生成される N_2O

を解析した。

安定同位体トレーサー法を用いた AOB 培養における N_2O 生成の実証例 ($^{14}NH_4Cl$ 84 mg-N/L と $Na^{15}NO_2$ 15 mg-N/L を添加した培地で好気培養した場合) を図 46 に示す。AOB 純粋分離株は、4. で合成廃水において優占した *Nitrosomonas europaea* と同じグループに入る富栄養性の *Nitrosomonas* sp. GH22 株に加え、貧栄養性の *Nitrosomonas* sp. AL212 株を用いた。AL212 株は下水処理場の活性汚泥での優占種と一般にみなされている *Nitrosomonas* Group 6a に属し、その代表的な菌株として国際共同研究で全ゲノムが解読された。この菌株を保有するのは我が国 (中央大学) だけである。この検討により検出された N_2O の N には NH_4 由来のものと NO_2 由来のものが含まれ、安定同位体トレーサーを使用することにより、それらを分別できることが実証された。本実験条件では、アンモニア酸化に加え、硝化菌脱窒も行われたことが示唆され、GH22 株は AL212 株よりも硝化菌脱窒活性が低いと考えられる。本研究で集積された *Nitrosomonas europaea* 群がこの結果と同様に下水汚泥のアンモニア酸化細菌よりも硝化脱窒経路の N_2O 生成が低いなら、開発システムのアドバンテージは高く、この予備的検討結果はこの課題への実証研究の動機づけとなろう。また、アンモニア酸化の中間代謝産物として知られる NH_2OH と NO_2 を無菌培地において好気条件で培養した場合、 NH_2OH と NO_2 から一分子ずつの N を持つ N_2O が化学的に生成されるポテンシャルがあることを示した。

様々な安定同位体トレーサーを用いた培養実験を廃水処理条件により近い条件で行えば、硝化処理において検出される N_2O の発生源および発生メカニズムの特定につながると考えられる。

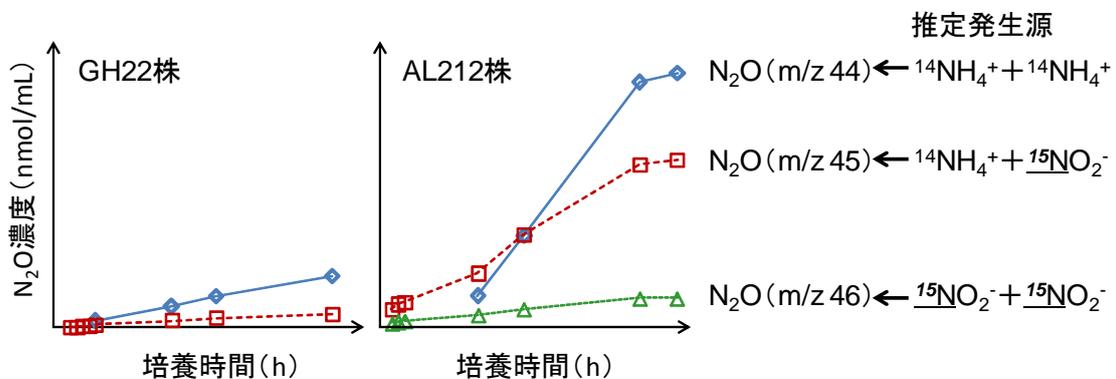


図 46 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ と $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ を添加して AOB を培養した場合に生成される N_2O の例

参考文献

Alonso-Casajús, N., *et al.*, (2006) Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 188:5266-5272.

Boogerd, F. C., *et al.* (1998) *atp* Mutants of *Escherichia coli* fail to grow on succinate due to a transport deficiency. J. Bacteriol. 180:5855-5859

Dauvillée, D. *et al.*, (2005) Role of the *Escherichia coli glgX* gene in glycogen metabolism. J. Bacteriol. 187:1465-1473.

Dawes, E. A., Ribbons, D. W. (1965) Studies on the endogenous metabolisms of *Escherichia coli*. Biochem. J. 95:332-343.

Noda, S. *et al.*, (2006) Alterations of cellular physiology in *Escherichia coli* in response to oxidative phosphorylation impaired by defective F1-ATPase. J. Bacteriol. 188:6869-6876.

James A. Mueller, William Charles Boyle, H. Johannes Pöpel: Aeration principles and practice: Water quality management library, 11. (2002)

北谷道則：活性汚泥生物の必要酸素量から考察した空気量削減方法：横浜市環境創造局，
<http://www.city.yokohama.jp/me/kankyou/data/gesui/>

Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. and Strous, M.: New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater: FEMS Microbiol., 27, pp.481-492 (2003)

Kuai L. and Verstraete W.: Ammonium removal by the Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system: Applied and environmental microbiology, 64, No. 11, pp. 4500-4506 (1998)

小笠原多佳子, 中村裕紀, 角野立夫：高濃度アンモニア廃水の亜硝酸型硝化・脱窒処理の検討：衛生工学シンポジウム論文集 5, pp. 146-150 (1997)

Kazuo Isobe, Keisuke Koba, Shingo Ueda, Keishi Senoo, Shigeaki Harayama, Yuichi Suwa. A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. *Journal of Microbiological Methods* (2011) 84; 46-51.

IV. 実用化、事業化の見通しについて

1. 実用化、事業化の見通しについて

1. 2 有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発

(株式会社日立プラントテクノロジー)

日立プラントテクノロジーではこれまで包括固定化担体を 7,000m³ 生産し、下水処理場や産業廃水処理場に納入し稼働している。硝化細菌を固定化した包括固定化担体で、古いものでは 18 年間稼働している。今回、内生呼吸低減菌を見出し、また亜硝酸型硝化の手法を見出した。これらの技術はこれまで納入し稼働している施設での活用が可能であり、曝気量を大幅に低減できる。22, 23 年度での実証試験を踏まえ、実用化できると判断する。

本技術は食品廃水、機械廃水、化学廃水、電子部品廃水、発酵廃水、下水、電力廃水など生物処理が可能なあらゆる廃水に利用でき、曝気エネルギー低減を達成できる見通しである。具体的には新設、既設に対応でき、特に既設設備については現在稼働している担体投入型循環変法の硝化槽に本開発担体を投入し、担体引き抜きアルカリ処理装置を備えれば曝気エネルギー低減を達成できる。(図1)

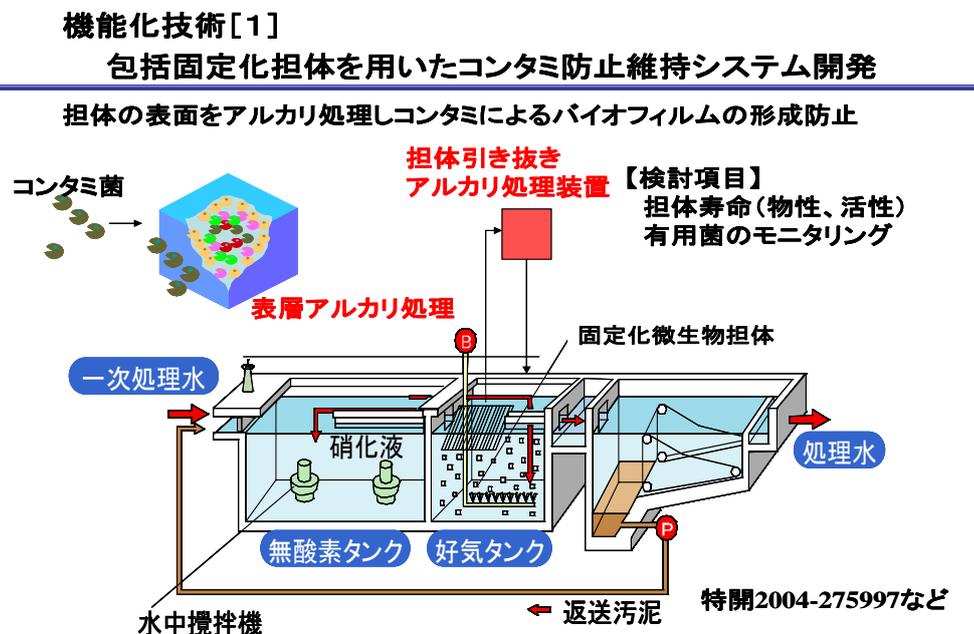


図1 包括固定化担体を用いた実用化概念図

(添付資料)

・特許論文リスト

(1) 研究論文・講演 4件

| 番号 | 発表者 | 所属 | タイトル | 発表誌名、ページ番号 | 査読 | 発表年 |
|----|--|-----------------|--|---|--------|-------|
| 1 | 生田 創 角野 立夫 | (株)日立プラントテクノロジー | 廃水処理の曝気量低減 に向けた基礎的検討 | 第43回日本水環境学会 年会講演集,2009,69 | 有 or 無 | 2009年 |
| 2 | 生田 創 角野 立夫 原山 重明 諏訪 裕一 | (株)日立プラントテクノロジー | Reducing Aeration requirement for Biological Wastewater Treatment | The 3rd IWA-ASPIRE Conference & Exhibition 2009(Taipei),150 | | 2009年 |
| 3 | 生田 創 角野 立夫 原山 重明 諏訪 裕一 | (株)日立プラントテクノロジー | pH ショック法を用いた亜 硝酸型硝化技術の検討 | 日本水処理生物学会 第46回大会(高知大会) 日本水処理生物学会誌 別巻第29号,2009,56 | | 2009年 |
| 4 | KEYA Chaman Ara 諏訪裕一 原山重明 生田 創 角野立夫 | 中央大学 | 活性汚泥構成菌の内生 呼吸 | 日本水処理生物学会 第46回大会(高知大会) 日本水処理生物学会誌 別巻第29号,2009,63 | | 2009年 |
| 5 | 生田 創 角野立夫 原山 重明 諏訪 裕一ら | (株)日立プラントテクノロジー | pH ショック法による亜硝 酸型硝化システムの評価 | 第44回日本水環境学会 年会講演集,2010,503 | | 2010年 |
| 6 | 原山 重明 諏訪 裕一ら | 中央大学 | A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. | Journal of Microbiological Methods (2011) 84; 46-51. | | 2011年 |
| 7 | 生田 創 諏訪 裕一 勝山 知恵 原山 重明ら | (株)日立プラントテクノロジー | 亜硝酸酸化活性に及ぼ す遊離アンモニアの影響 評価 | 第45回日本水環境学会 年会講演集,2011,36 | | 2011年 |
| 8 | 勝山 知恵 諏訪 裕一 原山 重明 生田 創ら | 中央大学 | 亜硝酸型硝化プロセスに おける亜酸化窒素発生抑 制条件の検討 | 第45回日本水環境学会 年会講演集,2012,37 | | 2011年 |
| 9 | 勝山 知恵 諏訪 裕一 原山 重明 生田 創ら | 中央大学 | 亜硝酸型硝化処理にお ける亜酸化窒素発生の 評価 | 第46回日本水環境学会 年会講演集,2012,42 | | 2012年 |

(2) 特許等 なし

(3) 受賞実績 なし

2.2 高濃度微生物保持DHSリアクターによる

溶存メタン・亜酸化窒素温室効果ガスの処理およびリン回収技術の開発

(広島大学)

2.2.1 緒言

嫌気性廃水処理は消費エネルギー量が少ない事などから、CO₂ 排出量削減の切り札として地球温暖化防止の観点からも注目され、その開発が進められている。しかしながら、嫌気性処理は温室効果ガスであるメタンの大気中への放出源となっている事も事実である。また、窒素除去プロセスを始めとした下排水の高度処理の普及にともなって、硝化、脱窒処理の際に発生する亜酸化窒素が問題視されている。特に近年、新規な窒素除去プロセスとして anammox 反応が注目されているが、このための部分硝化過程や硝化・anammox 一槽型処理過程で N₂O が生成され大気に放散される。これらは温室効果の非常に高いガスであり、嫌気性処理や anammox プロセスは環境にやさしい技術と思われるようであるが、トータルの地球環境負荷を鑑みると、溶存メタンや N₂O の大気放出防止がなされなければ、決してやさしい技術とは言えない。また、余剰汚泥が発生しない処理システムは非常に好ましい排水処理方法であるが、余剰汚泥が発生しないという事は一般的に用いられているリン蓄積細菌を利用するリン除去プロセスが使用できないという事である。したがって、汚泥レスシステムでもリンの除去・回収できる技術開発は水環境の保全、資源回収という観点から非常に重要な課題である。

このように、溶存メタンや N₂O の分解は地球温暖化防止の観点から、また資源回収の観点からリンの回収は重要である。我々はこれらの課題解決のためには、微生物保持能力が高く、エアレーションなしに酸素供給能に優れている好気性 DHS リアクターが処理装置として適しているのではないかと着目している。DHS リアクターは一種の散水ろ床法であるが、微生物保持担体にスポンジが使用され、これにより高濃度微生物保持が可能である。スポンジ担体は水中に浸漬されておらず、空気中に吊されているため、空気中の酸素が排水に溶解込み、また排水はスポンジ内部に重力でしみ込むため、酸素の微生物への供給は拡散ではなく移流によって運ばれ、スポンジ内部に生息している微生物も十分酸素にありつける。この DHS リアクターはインドや国内で下水処理の実証段階にあり、処理性能の素晴らしさは公表されている。

そこで、広島大学ではDHSリアクターを利用し、①嫌気性処理水に溶存しているメタンの酸化分解、②亜酸化窒素(N₂O)の分解、③処理水中からのリン回収、の3つの研究開発を行う。これら研究課題は、今までにない新規性があり、また産業技術に欠かせない重要な環境保全テーマである。

2.2.2 嫌気性処理水に溶存しているメタンの酸化分解

2.2.2.1 研究概要

メタンは地球温暖化に及ぼす影響がCO₂に次いで2番目に大きいとされている温室効果ガスの1つであり、その排出削減は非常に重要な課題である。人間活動に由来するメタン放出源の1つとして廃水・廃棄物の処理がある。特に埋立地から放出されるメタンは、地球上の全メタン放出

量の 6.7%を占める¹⁾ほど多量であることから、その回収利用や微生物分解による放出防止技術等が盛んに研究されている。嫌気性廃水処理は消費エネルギーが少ない、メタンガスを回収できる等、近年では CO₂ 排出量削減の観点からも注目され、その開発が進められている。しかしながら、これら嫌気性処理プロセスから排出される浸出水もしくは処理水などに含まれる“溶存メタン”に関してはあまり注目されていないのが現状である。UASB リアクター等の嫌気性処理水中のメタン濃度は生成バイオガスのメタン分圧に依存するが、約 1 mol·m⁻³ であり、この溶存メタンが処理水の放流とともに大気に放散されている。メタンは CO₂ の 25 倍もの温室効果ガスであり、微量でも地球温暖化の原因となっている。溶存メタンの揮散はこれまで無視されてきているが、実はかなりの量である。活性汚泥法はエネルギー消費型のプロセスではあるが、ここから排出される CO₂ 量は 0.28 kg CO₂·m⁻³ である。一方、溶存メタンの揮散量を CO₂ に換算すると 0.37 kg CO₂·m⁻³ であり、嫌気性処理技術は環境にやさしいとは決して言えない。嫌気性処理の特長を生かすには、溶存メタンの大気への放散を防止する技術を開発することが必要不可欠である。

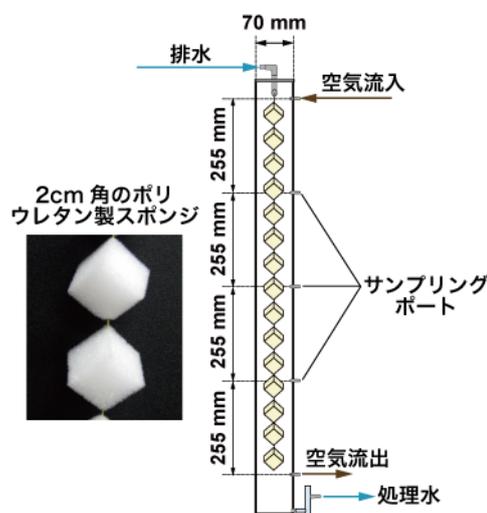
2.2.2.2 研究目的および目標

嫌気性廃水処理は消費エネルギー量が少なくバイオガスとしてエネルギー回収ができるなど、地球環境の観点からも注目され、その開発が進められている。しかしながら、上述のように嫌気性処理水中に含まれる溶存メタンからはかなりの量のメタンが大気中に放散しており、このまま放っておいては地球環境にやさしい技術とは言い難いのが現状である。そこで本研究では、溶存メタンを分解除去することにより、排水処理プロセスから排出される温室効果ガスを削減する。

このような溶存メタンの処理を目的とした処理プロセス・リアクターは、我々の知る限り 1 例²⁾のみであり、溶存メタン処理に関する基礎的な知見は非常に不足している。そこで、まずは密閉型 DHS リアクターにより溶存メタンが大気に放散されることなく、DHS リアクター内で微生物酸化される事を実証することを本プロジェクトの中間目標に掲げた。そして、溶存メタン処理の基礎的知見を得る目的で、嫌気性処理水を模擬した人工排水を作成し溶存メタンの処理実験を行った。

2.2.2.3 研究内容

実験には直径 7 cm、高さ 110 cm の円筒形の密閉カラム内に 2 cm 角のポリウレタン製のスポンジ担体をリアクター上部よりひもで吊るした密閉型の懸垂型スポンジ担体リアクターを用いた (図 1)。植種には活性汚泥を用いた。メタンガスでパージをした無機人工排水をリアクター上部より流下させ、同時にリアクター上部より空気供給を行い、排水中に含まれる溶存メタンの酸化分解を行った。リアクターの運転は、phase 1 (day 0 - 60): HRT 2 時間、空気供給量 0.95 L·day⁻¹、phase 2 (day 61-128): HRT 2 時間、空気供給量 2.5



III-2-2-2 図1 実験に用いた DHS リアクターの概要

L·day⁻¹, phase 3 (day 129-204): HRT 1 時間、空気供給量 2.5 L·day⁻¹, phase 4 (day 205-): HRT 0.5 時間、空気供給量 2.5 L·day⁻¹, の条件で 20℃で行った。

実験の結果、運転開始から 3 週間程度でメタン除去率 97%以上に到達し、その後、phase 1 では平均して 95 %以上の高いメタン除去を安定して達成できた (図 2)。空気供給量を増加 (スポンジ体積当りの空気供給量は 10 m³·m⁻³·day⁻¹) させた phase 2 でも phase 1 とほぼ同等のメタン除去が達成できた。そこで、HRT を短縮し流入メタン負荷を上昇させてい

たところ、HRT1 時間の phase 3 でメタン除去率約 90%を達成した。現在は、さらに負荷を上昇させ、また空気供給を工夫する事で、より高性能なリアクターをめざし運転を継続している (phase 4)。

Phase 1 ではアンモニア酸化はほとんど進行しなかった。しかし、phase 2 では空気供給量を増加させた直後からアンモニア酸化が進行し、硝酸が生成した。しかしながら、HRT を短縮し負荷を増加させていった phase 3 ではアンモニア除去速度は減少した。これら DHSリアクターにおける硝化とメタン酸化の挙動は、メタン酸化の方が硝化よりも優先して進行する事を示している。アンモニア酸化細菌とメタン酸化細菌は酸素をめくり競合関係にあり、メタン酸化細菌の方が酸素に対する親和性が高い事から、酸素制限下ではメタン酸化細菌の方が優占するという報告もある³⁾。したがって、本実験でも酸素が硝化とメタン酸化の制限要因の1つであると考えられる。

クローン解析の結果、Phase 1 ではリアクターの上部、中部には *Methylobacter*、下部には *Methylocaldum* 属に近縁な細菌が主要なメタン酸化細菌として検出された (図 3)。また、リアクター下部では type II のメタン酸化細菌である *Methylocystis* も全クローンに対し 4%ほど検出された。しかしながら、全クローンに占めるメタン酸化細菌の割合はいずれの箇所においても 30%程度であった。一方、メタノール酸化性細菌である *Methylophilus* がリアクター上部では特に多く検出された (全クローンの

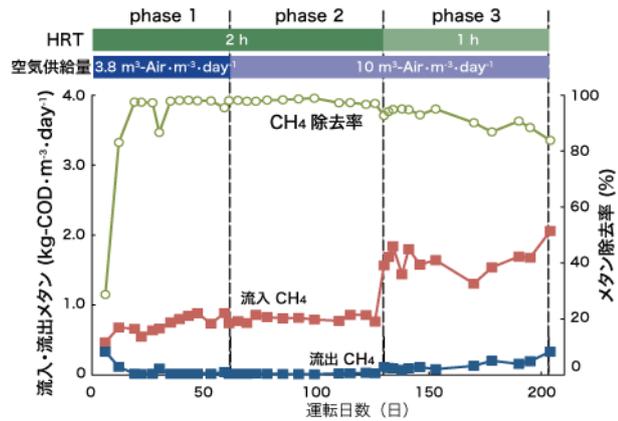


図2 DHSリアクターの運転条件とメタン除去性能

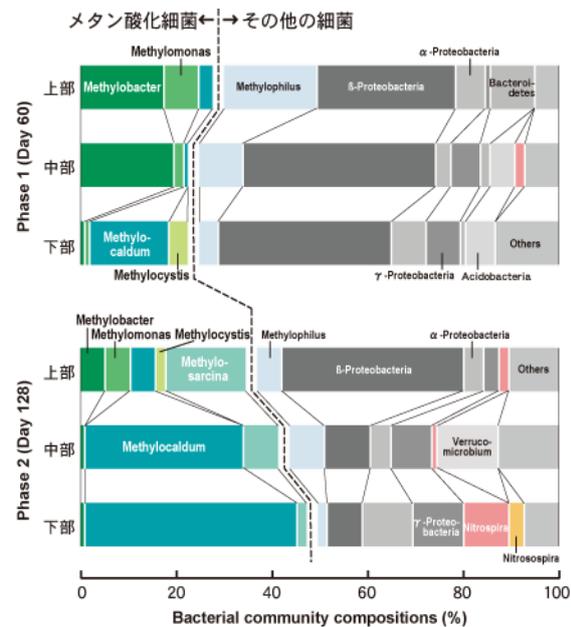


図3 DHS リアクター保持汚泥の16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析結果。細菌を標的としたプライマーセット (EUB338-1492R) を使用。

20%)。このことから、空気供給量の少ない phase 1 においては、メタン酸化の中間代謝物としてメタノールが生成しているのではないかと推察された。 phase 2 ではメタン酸化細菌の割合は増加し、全クローンに対し 40-50 %程度を占めた。また、その構成も変化し上部では *Methylosarcina* の割合が増加した。中部および下部では *Methylocaldum* 属に近縁な細菌が主要なメタン酸化細菌であった。このように、DHS リアクターを用いる事で、メタン濃度に応じた最適なメタン酸化細菌群を維持する事ができたため、非常に効率的にメタン酸化が達成できたと考えられる。

2.2.2.4 研究成果

本研究では密閉型 DHS リアクターを使用し、アンモニアと溶存メタンを含むシンプルな模擬廃水を用いて溶存メタン除去実験を行った。その結果、メタン酸化はリアクター運転開始後速やかに立ち上がり、その後安定して進行する事や、メタン酸化はアンモニア酸化よりも酸素に対する親和性が高く、優先して起こる事が分った。また、リアクター内でメタン除去を主に担っているのは γ -Proteobacteria に属する type I のメタン酸化細菌である事がわかった。今後は、実際の嫌気性処理水に含まれているであろう、硫化物や有機物を含んだ排水での処理実験を行い、メタン酸化とこれら物質との酸化反応の競合関係を明らかにし、高いメタン除去率と除去速度を両立しうる運転条件 (HRT および空気供給量) の検討が済めば、実排水に適用できると考えられる。

これまでの研究で得られた結果を基にして、溶存メタン処理 DHS を導入する事で削減できる温室効果ガス排出量(CO₂ 排出量)を試算すると以下ようになる。

溶存メタン処理対策を施していない従来型の嫌気性処理(UASB法;処理槽高さ5m)の場合、ポンプ動力と溶存メタンの大気への放出を合わせると、CO₂ 排出量は0.304 Kg-CO₂・m⁻³となる。一方、溶存メタン処理 DHSリアクター(高さ5m、溶存メタン除去率90%)を用いる事で、DHSリアクターに用いるポンプ動力を考慮した上でも、全体の CO₂ 排出量は0.0461 Kg-CO₂・m⁻³となり、密閉型 DHS リアクターの導入で CO₂ 排出量は1/6以下に削減できる。

2.2.3 N₂O ガス分解 DHS リアクターの開発

2.2.3.1 研究概要

亜酸化窒素(N₂O)は CO₂ の約 310 倍の温室効果をもち、現在地球温暖化に 6%程度寄与する非常に強い温室効果ガスであり、京都議定書でも削減対象の一つとされている。排水処理施設で窒素除去プロセスとして用いられている生物学的硝化脱窒法からも多量の N₂O が生成しており、その対策が急務とされている。この亜酸化窒素は脱窒し、窒素に還元することで処理を行うことが出来る。脱窒には一般的に有機物が電子供与体として用いられるが、近年メタンを用いた脱窒が注目されている。メタンも生物学的排水処理法によって発生する温室効果ガスであるが、安価な炭素・エネルギー源であり、脱窒に用いる上で優れた点が多い。メタンを用いた脱窒はメカニズムが不明な部分があるが、一般的にはメタン酸化細菌がメタンを酸化する過程で放出する中間代謝物を脱窒菌が利用していると考えられている。好気的環境下でのメタン脱窒は以前から知られていたが、近年メタンを用いた嫌気的環境下での硝酸・亜硝酸の脱窒を行う微生物の報告がされた

4)。嫌氣的なメタン脱窒の場合、酸素供給のための曝気が不要であり、エネルギーコストを抑えることが出来る。また曝気による亜酸化窒素、メタンの大気中への放散も防ぐことが出来る。よって、この微生物を利用すれば亜酸化窒素とメタンの効率的同時処理が出来るのではないかと考えられる。

上述のように生物学的に N_2O は脱窒反応の過程により N_2 に還元することができるが、有機物の継続的な添加が必要である。 N_2O を生物学的に酸化することができれば有機物は不要となり N_2O を除去する上で大幅なコスト削減になるが、そのような反応の報告例はない。 N_2O が NO_2 もしくは NO_3^- に酸化する反応を考えると、自由エネルギー変化量はマイナスであり熱力学上生物学的酸化反応は進行可能であると思われる事から、これらの反応を利用してエネルギーを獲得する何らかの微生物が存在している可能性がある。

そこで、本研究では N_2O の生物学的除去を目指し、新規密閉型 DHS リアクターを用いた N_2O 除去プロセスの構築を目指した。

2.2.3.2 研究目的および目標

窒素除去プロセスから発生する N_2O ガスは非常に強力な温室効果ガスであり、近年特に問題となっている。特に、最近 anammox 反応を利用した窒素除去プロセスの研究が盛んであり、我が国にも実処理装置が1基稼働している。このプロセスではアンモニアを亜硝酸イオンまでで酸化を止める部分硝化が必要であり、この反応は低酸素で行うことができる。また部分硝化と anammox 反応を一槽のリアクターで窒素除去することも可能である。したがって、anammox 反応を利用した脱窒処理は、通常硝化・脱窒プロセスと比較して、消費エネルギー、汚泥排出量の大幅削減が期待できる次世代型プロセスと目されている。しかしながら、この anammox プロセスでは窒素の一部は N_2O にガス化して大気に放出されている。申請者らの実験および Kampschreur らの報告⁵⁾によるとアンモニア性窒素の5~10%が N_2O としてガス化している。この量は非常に多量であり、 N_2O の問題を解決しない限り anammox プロセスは環境にやさしいプロセスとはなり得ないのではないかと考えられる。

そこで本研究では、 N_2O ガスを脱窒あるいは酸化処理する事で排水処理プロセスから排出される温室効果ガスを削減する。この N_2O ガスの処理には脱窒あるいは酸化処理が考えられる。特に N_2O ガスの酸化分解は今までにその報告が無い事から、まずは人工排水およびガスを用い DHS リアクター内で酸化分解、亜硝酸イオンあるいは硝酸イオンへの転換の確認、を本プロジェクトの中間目標に掲げた。一方の、脱窒処理に関しては有機物の添加による N_2O の脱窒は通常反応であるため、本研究では特にメタンを用いた嫌氣的 N_2O ガスの還元処理を最終目標とし、中間目標では人工排水およびガスを用いて、DHS リアクター内での N_2O ガスの分解の確認を目標とした。

2.2.3.3 研究内容

好気条件下での回分培養実験は、複数の下水処理場の活性汚泥を植種源としてそれぞれ用

いて 124ml のバイアル瓶で行った。無機塩培地に N_2O を入れ、好気状態を保ち $25^{\circ}C$ 、170rpm で振とう培養を行った。培養前、培養中、培養後にガスクロマトグラフによりバイアル瓶中の気体濃度を測定し、 N_2O が減少しなければ pH などの条件を変え、実験を繰り返した。また、イオンクロマトグラフにより培養前後にイオン態窒素濃度を測定し、窒素量の物質収支を測定した。さらに N_2O が減少した培養系では、液量の 1/2~1/4 を継代培養に用いて、 N_2O 酸化分解微生物の集積を試みた。回分培養の結果、初期微生物濃度を高めに設定した培養系では N_2O の減少が確認できたが、酸化分解時に発生すると考えられる硝酸・亜硝酸があまり蓄積せず窒素収支が合わない、また N_2O 減少が途中で止まってしまう等の現象が観察された(図4)。ただし、水銀を添加し微生物の生育を阻害した培養系ではこのような現象は確認されなかった。このことから、 NO 等の中間代謝物が蓄積している可能性が考えられた。

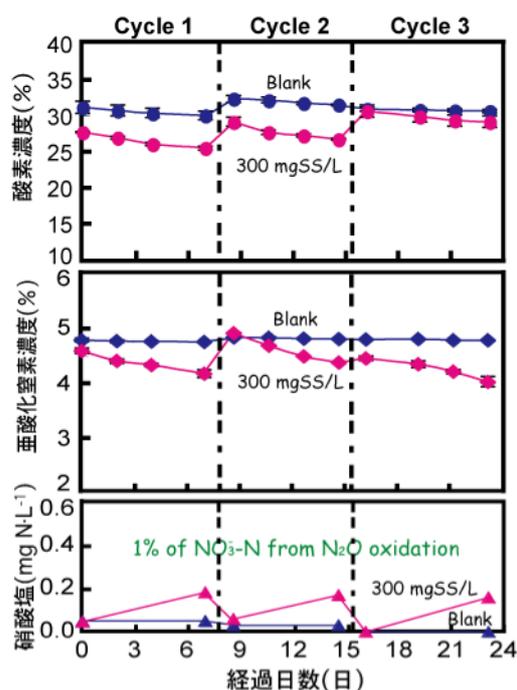


図4 好气的条件下で亜酸化窒素分解微生物の集積培養実験の結果

連続培養実験は高さ 60cm のベンチスケール DHS リアクターを用いて、溶存 N_2O を流入し実験を行った。一年にわたる運転期間中、 N_2O と O_2 の減少が継続して確認されており、また、運転日数を重ねるごとに減少量が増加したことから、微生物作用的な反応であることが確認できた。しかしながら、基質供給量を段階的に増やして運転を行ったところ、流出水から検出されていた NO_3^- が消失し、かわりに窒素ガスの生成量が増加するといった現象が見られた。連続培養実験終了時にスポンジ担体バイオマスに対して行った細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析では、アンモニア酸化古細菌 (AOA) や *Nitrospira* 属の亜硝酸酸化細菌に近縁なクローンが検出された。AOA については古細菌クローンライブラリーの90%以上を占めていた。 N_2O 以外の窒素源の供給は無かったにもかかわらず、これだけのポピュレーションを維持するためには、 N_2O 分解に何かしら関与してエネルギーを得ていると考えられ、AOA が N_2O を NO_3^- に酸化していることが示唆された。

嫌気条件下での回分培養実験は、容積 720mL のバイアル瓶を用い、植種源として水田土壌を使用した。液体培地には嫌気性無機人工培地を用い、気相部を純メタンで満たし、スポンジ担体を使用した系と使用しない系を作成し、 $30^{\circ}C$ で攪拌および静置培養を行った。培養の結果、硝酸の脱窒に伴ってバイアル内のメタンの減少が確認できた。培養は無酸素条件下で有機物を添加せずに行ったことから、メタン及び硝酸の減少は嫌气的メタン酸化と脱窒によるものであると考えられる。またメタン減少量と硝酸減少量の比についても、全ての培養系で嫌气的メタン脱窒の理論値($CH_4:NO_3=5:8$)に近い値をとった。しかし培養初期の約1ヶ月間の硝酸の減少速度が、そ

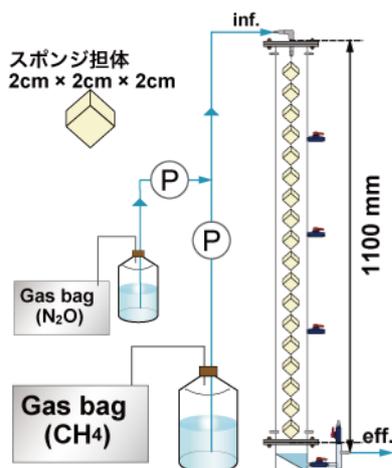


図5 メタンを用いた亜酸化窒素除去実験に用いたDHSリアクターの概略。DHSリアクターは直径68mmの円筒形カラムで、その内部にスポンジ担体を吊るしている。

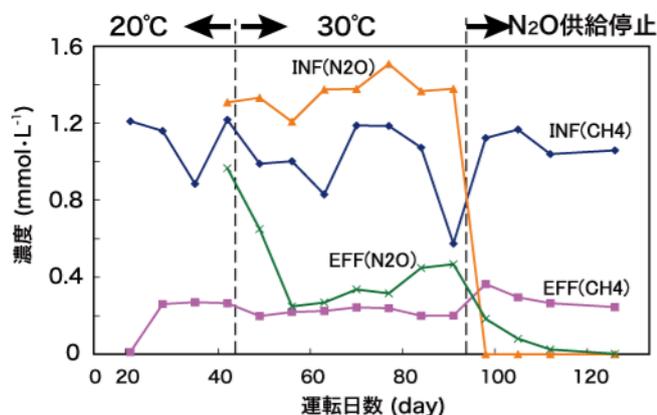


図6 DHS リアクターを用いた亜酸化窒素ガス分解実験の結果。実験は温度条件およびガスの供給条件を変更して行い、メタンをもちいた亜酸化窒素の脱窒性能を調査した。

れ以降の硝酸減少速度に比べ速いことから、植種に用いた水田土壌中に存在していた有機物が、硝酸の脱窒に関与しているのではないかと考えられる。このことから、実際にメタンを用いて行われた硝酸の脱窒量は測定値よりも若干小さくとなると考えられる。

連続培養ではラボスケール DHS リアクター(図5)を用い、基質として嫌気性無機人工排水に硝酸ナトリウム 1mM 添加し、 N_2O とメタンを溶存させたものを流量比 9:1 となるようポンプで送り込みリアクター上部から流入させた。運転の結果、各溶存ガスは培養 30 日目には減少が確認された(図6)。また硝酸についても $0.1\sim 0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ の減少が確認できた。しかし Phase 1 では溶存亜酸化窒素減少量に対し、溶存メタン減少量が大きかった。これは添加した硝酸の減少量を考慮した場合でも約 1.8 倍程度多くメタンが減少している。そこで Phase 2 として溶存亜酸化窒素の流入を停止して運転を行い溶存メタン濃度の変化を観察した。その結果溶存メタンは溶存亜酸化窒素の有無に関わらず大幅に減少していることが確認された。この原因として本実験で用いたリアクターは、スポンジ担体の充填率が約 5% と低く、気相部が全スポンジ容積に対し非常に大きいため、気相部と流入基質においてガス濃度が平衡に達しておらず、溶存ガスが気相部に放散していると考えられた。そのため流入基質から想定される気相部の平衡時の濃度の亜酸化窒素・メタン混合ガスを作成、充滿させて運転を再開し亜酸化窒素とメタンの反応比についての調査を行い、これを Phase 3 とした。Phase 3 では流出の溶存、及びリアクター気相部の亜酸化窒素・メタン濃度の減少が確認された。量論的に安定した結果はいまだ見られていないが、嫌気的なメタンと亜酸化窒素の処理がなされることを確認した。この嫌気的なメタンと亜酸化窒素の減少は、植菌を行わないスポンジを用いた同様のリアクターによるブランク試験との比較結果から、減少量のすべてが微生物分解とはいかないまでも、大部分が微生物作用によるものであると確認が出来た。

2.2.3.4 研究成果

嫌気的 N_2O 処理実験では、バッチ培養実験と DHS リアクターを用いた連続培養実験の二つの

実験を行った。いずれの実験においても嫌気メタン脱窒が行われていると考えられる測定結果を得ることができた。また DHSリアクターを用いた連続培養実験では、亜酸化窒素を嫌気メタン脱窒によって除去することが可能であることを確認することが出来た。

好氣的 N_2O 処理実験でも嫌氣的処理実験と同様にバッチ培養実験と DHS リアクターを用いた連続培養実験の二つの実験を行った。これら対照実験の結果から、生物学的な作用による N_2O の酸化除去ができることが確認できた。好氣的 N_2O 酸化分解反応はアンモニア酸化古細菌の関与が強く示唆されたが、窒素の収支が取れておらず、代謝経路の解明までには至らなかった。

これまでの研究で得られた結果を基にして、 N_2O 処理 DHS を導入する事で削減できる温室効果ガス排出量 (CO_2 排出量) を試算すると以下ようになる。

従来の硝化脱窒もしくは Anammox プロセスからは窒素除去の 0.5-6.7% が N_2O になっていると報告されている⁵⁾。この N_2O 放出量は CO_2 換算で $0.0598-1.23 \text{ Kg-CO}_2\cdot\text{m}^{-3}$ である。一方、この従来型のプロセスに、高さ5m の DHS リアクターを増設し発生する N_2O の90%を除去したとすると、プロセス全体の CO_2 排出量は DHS リアクターに用いるポンプの動力を加味しても、 $0.0142-0.131 \text{ Kg-CO}_2\cdot\text{m}^{-3}$ となる。したがって、本プロジェクトで開発を行っている N_2O 除去 DHS リアクターを付加する事で CO_2 排出量は従来比 $1/4\sim 1/9$ に削減できる。

2.2.4 リン除去・回収 DHS リアクターの開発

2.2.4.1 研究概要

リンは水域の富栄養化の原因物質の1つであり、我が国においては閉鎖性海域の水質改善を目的に、第5次水質総量規制より規制対象物質として規制の対象となり、適切な負荷削減対策の実施が求められている。下水中からのリン除去法としては物理化学的方法と生物学的リン除去法がある。このうち、物理化学的方法の代表的な手法である晶析脱リン法は、下水の前処理やリン除去に用いる薬剤のコスト等問題から日本ではほとんど普及していない。一方の生物学的リン除去法は、嫌気条件下においてリンを吐き出し、その後の好気条件下において吐き出した以上のリンを摂取する、という性質をもつポリリン酸蓄積細菌の作用を利用したものである。その運転方法は嫌気条件と好気条件を繰り返すように汚泥の返送を行うものであり、リンを高濃度に蓄積した微生物(汚泥)を引き抜く事で、水系よりリンを除去する。したがって、生物学的リン除去プロセスは必然的に余剰汚泥を発生させるシステムである。

リンは富栄養化を引き起こす厄介者というだけではなく、現代社会にとって必須な資源でもある。リンは将来的に枯渇する事が確実視されている事から、リンを100%輸入に頼っている我が国においては、リン資源の回収・再利用が緊急の課題となっている。そこで、下水中に含まれるリンが資源として注目を浴び、資源として回収しようという研究が盛んに行われている。ところが、生物学的リン除去プロセスは汚泥を作る手法であり、その処分に費用がかかる。またもう一方の晶析法でも薬剤コストの問題がある。したがって、現状においてはいずれの手法を用いてもコスト高の問題からリンを資源として回収しても採算が合わないのが現状である。

排水処理においては汚泥の処分コストが最も厄介な問題であるため、余剰汚泥の排出が少な

い処理プロセスが求められており、様々な余剰汚泥削減プロセスが研究・開発されている。したがって、富栄養化対策および資源回収の観点から、余剰汚泥レスのプロセスからの低コストリン回収プロセスの創出が求められている。そこで、本研究では余剰汚泥の引き抜きに依存しない、新規な生物学的リン回収システムの開発を目的とした。

2.2.4.2 研究目的および目標

従来の生物学的リン除去プロセスでは嫌気と好気条件を繰り返すことでポリリン酸蓄積細菌にリンを取り込ませ、その汚泥を回収することでリン除去が行われる。したがって、余剰汚泥の発生しない水処理プロセスは非常に好ましい方式であるが、このような方式では、従来型のリン除去法は適用できない。またリン除去プロセスを持たない処理施設も多くあり、これらの処理水からリンを除去し回収することは緊急の課題である。

我々のこれまでの研究の結果から、DHSリアクターによる下水処理においてメカニズムの解明は不十分であるものの、余剰汚泥レスが達成されていることを確認している。我々は、DHS リアクターの様な汚泥レスプロセスからも余剰汚泥を発生させることなく、リンを資源として回収するプロセスができないかと考え研究を行ってきた。その結果、密閉型 DHS に空気送風量を制御して嫌気・好気を繰り返すことで、リン蓄積細菌をスポンジ内に特異的に生息させる。好気時にはリン除去未処理水中のリンをリン蓄積細菌に摂取・蓄積させ、嫌気時に下水などの有機物源を供給すれば、蓄積したリンが放出されて高濃度のリン含有水が得られるため、余剰汚泥を経由せず直接にリン回収を行うことができる。という手法を考案した。ただし、高濃度の液としてリン回収は原理的に可能であるが、実用化のための知見が非常に乏しいのが現状であった。

そこで、本研究プロジェクトでは密閉型 DHS を用いたリン回収を最適化するため、まずはより運転管理の簡単なチューブリアクターを用いて、回収リン濃度を流入リン濃度の 10 倍以上に濃縮された液として回収することを中間目標として掲げ研究を開始し、さらに回収リン濃度をより高度化する運転手法の開発を目指した。

2.2.4.3 研究内容

まず、密閉型 DHS と同様な Plugflow 型リアクターでのリン回収の可能性とそれに適した時間条件を検討する為にビニルチューブを使用した Plugflow リアクターを運転した。使用したチューブは長さ 3 m、内径 5 mm (容積 0.06 L)、植種源は活性汚泥を用い、HRT 10 分で運転した。嫌気・好気時間の比を 1:2、1:3、1:5 とし、嫌気好気の 1 サイクル時間を 6 ~ 24 時間の間で設定したリアクターを運転し、リン摂取・放出能を

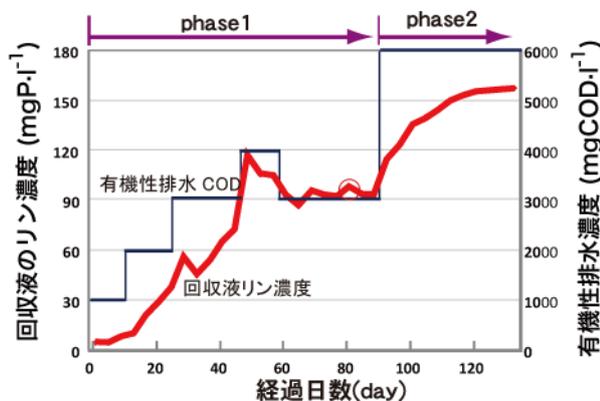


図8 DHSリアクターを用いたリン高濃度化の結果

評価した。その結果、最も良好なリン摂取・放出は12時間サイクルにおいて見られた。また、24時間サイクルではリンの摂取・放出共にほとんど見られず、嫌気時に有機物を摂取していなかった事からサイクル時間が長すぎると悪影響が生じることが示唆された。一方、有機物の摂取は18時間サイクルが最も良かった。そこで、このチューブリアクターで見いだされた嫌気・好気時間のサイクル(嫌気4時間、好気8時間)を使用し、ベンチスケール DHS リアクターを作成しリン回収実験を行った。また、この運転の際には嫌気時のリン含有水を循環して使用する事で、回収リン濃度を飛躍的に高濃度化できる新たな運転方法(H21年2月 特許出願、特願 2009-044797)を考案し、その実証も行った。

その結果、運転日数の経過と共に回収リン濃度が上昇する事が確認できた(図8)。その後、流入する有機性排水量と回収液量を半分にし、同時に有機性排水の濃度を2倍の6000 mgCOD・L⁻¹に変更した。その結果、徐々にリン濃度は高くなり158 mgP・L⁻¹(好気流入リン濃度の31.6倍)に達した。この濃度はMAP法等のリン回収法に適用可能な濃度である。リアクター内のリン収支を調べた結果、リンを高濃度化して回収できているものの、リンの回収率は20-30%と比較的低いものであった。そこで、どのような原因でリン回収率が低下しているのかを詳しく調査した結果、回収リン濃度とリン回収率はトレードオフの関係にあるという事が判明した。

スポンジ担体より汚泥を採取して微生物叢をFISH法により解析したところ、スポンジ表面部では全細菌に対するPAOsの割合は58%を占めており、本装置は高濃度にPAOsを保持できることが分かった(図9)。さらに、汚泥中の微生物を16S rRNA 遺伝子に基づいてクローン解析を行ったところ、スポンジ表面部ではPAOsが属する*Rhodocyclus*属に近縁な種が多数検出された(図10)。また、汚泥のリン含有量を調べたところ、リン含有量は嫌気終了時と好気終了時で7.01 mgP・gVSS⁻¹差が生じていた。以上を踏まえると、DHSリアクターを用いる事でリン蓄積細菌を優占的に高濃度に保持する事が可能となり、このような高性能リン回収リアクターが構築できたものと考えられる。

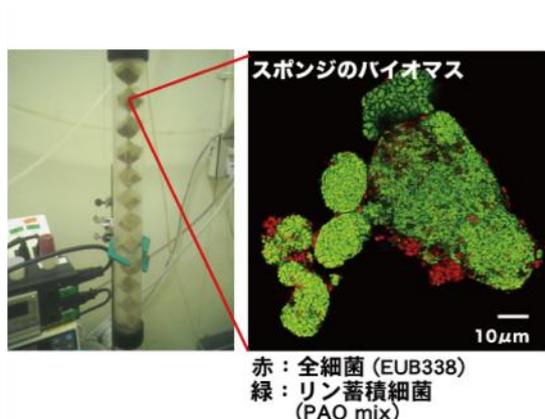


図9 ベンチスケールリン回収 DHSリアクター(左)と DHS リアクターより採取した汚泥を用い、リン蓄積細菌を標的とする PAOmix プローブで FISH を行った結果(右)

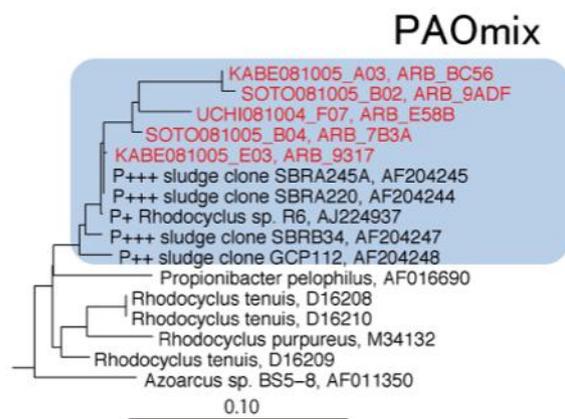


図10 ベンチスケールリン回収 DHSリアクターより採取した汚泥を細菌の16S rRNA 遺伝子を標的としてクローン解析を行った結果。赤字は本研究で得られたクローン配列で、系統解析の結果、*Rhodocyclus* 属に属したものを示している。

2.2.4.4 研究成果

プラグフロー型リアクターにより、リン蓄積細菌にとって最適な嫌気・好気時間を検討し、最も良好なリン摂取・放出は 12 時間サイクルであることを見いだした。そして、DHS リアクターにその 12時間サイクルを適用し、さらに、新規に考案し特許出願を行った運転方法によって、低濃度リン含有水 ($5 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$)を $158 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ (31.6 倍) に濃縮し、回収する事が出来た。DHS スポンジ担体の微生物叢を FISH 法および 16S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析、分子系統解析で分析を行ったところ、スポンジ表面部ではリン蓄積細菌 (PAOs) の構成比は 58%という高い優占率であった。この事から DHS リアクターを用いる事で PAOs を優占的に高濃度に保持する事が可能となり、このような高性能リン回収リアクターが構築できたものと考えられる。しかしながら、リン回収率が低いという問題が存在しており、今後はリンの回収率向上を目指した運転方法の開発が必要となってくる。

これまでの研究で得られた結果を基に、リン回収 DHS を既存のリン除去施設を持たない下水処理施設に導入する事で削減できるリン回収コストを試算すると以下ようになる。

余剰汚泥を発生させない下水処理プロセスに、従来型のリン除去回収プロセスを付加する場合、下水中のリン濃度は $5 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ と低い事から、一般的に晶析法 (HAP 法) が適用される。その場合のリン除去・回収コストは排水 1 m^{-3} 当たり 37.3 円である⁶⁾。一方、DHS リアクターによるリン除去回収プロセスの場合、DHS によりリン濃度を 20 倍に濃縮してから MAP 法によるリン回収を行う。そのため、MAP 法を行う処理水量は元の $1/20$ となる。したがってリン回収コストは、 $23.1 \text{ 円}\cdot\text{m}^{-3}$ (MAP 法のコスト) $\times 1/20 = 1.2 \text{ 円}\cdot\text{m}^{-3}$ となる。これに、DHS の電気代 $2 \text{ 円}\cdot\text{m}^{-3}$ を追加し、嫌気処理時に使用する酸発酵液の費用を考慮に入れても、DHS リアクターを用いてリン回収を行う事で、従来型のリン除去回収プロセスと比較して、リン回収コストを $1/3$ 以下に削減する事が可能となる。

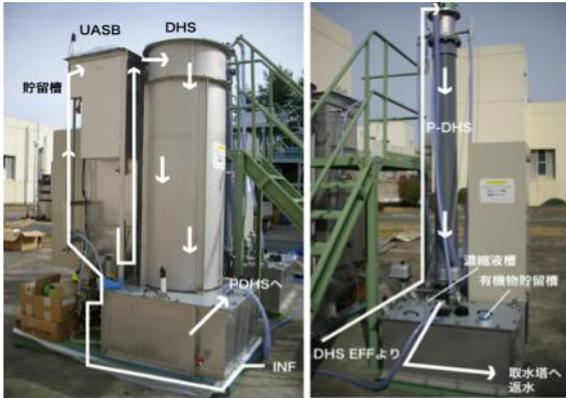
2.2.5 パイロット規模装置による実下水からのリン回収の実証試験

2.2.5.1 研究目的および目標

上述のラボスケールでのリン濃縮実験の成果を受けて、実下水からのリン回収の実証試験に取り組んだ。リン含有処理水を供給するための UASB-DHS システムと共に、リン除去回収 DHS リアクターを東広島浄化センターの敷地内に設置した。室内実験と同様に、リン濃度 $100 \text{ mg-P}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上の濃縮液の取得、そして、実下水処理の運転を通してのリン除去・回収性能を向上させるノウハウの蓄積と運転・操作方法の確立を目標に掲げて実験を行った。

2.2.5.2 研究内容

前段の UASB-DHS システムは、容積 100L の沈殿槽、容積 500L の UASB リアクター、有効容積 (スポンジ担体充填容積) 250L の DHS リアクターで構成されている (図 11 左)。処理水量は 1



下水処理 UASB-DHS システム リン除去回収 DHS システム

図11 東広島浄化センター内に設置したパイロット規模のリン回収実験装置。(左) リン含有処理水を供給するための UASB-DHS システム。(右) リン除去・回収 DHS リアクター。

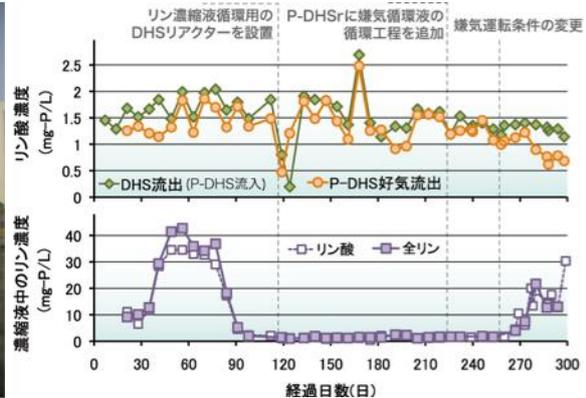


図12 好気運転時のリン除去性能（上）および、濃縮液槽のリン濃度（下）の経日変化。破線部は後述する運転条件の切り替えを示している。濃縮液中の大部分は溶存態のリン酸であることが下部のグラフからは読み取れる。

$\text{m}^3 \cdot \text{day}^{-1}$ として UASB で HRT12 時間、DHS で HRT6 時間かけて処理された後、後段のリン除去・回収 DHS リアクターへと供給される。実証試験期間中の流入下水の有機物濃度は COD_{Cr} で $266 \pm 58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、BOD で $171 \pm 39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ であったが、DHS リアクター通過後はそれぞれ $36 \pm 13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (除去率>90%)、 $14 \pm 12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (除去率>92%)であり、後段のリン除去・回収 DHS リアクターに適した良好な処理水質が得られた。

リン除去回収 DHS リアクターは高さ 2.2 m、有効容積 66 L の円筒容器に、中抜き円筒型の布担体（ポリエステル製）を有効容積 5 L で充填している。流入排水の滞留時間はリアクター容積で 1 時間、担体容積で 7.2 分である。運転開始初期は好気運転 9 時間（前段の UASB-DHS システム 処理水の供給）、嫌気準備運転 2 分（有機物含有溶液と貯留していたリン濃縮液の供給）、嫌気運転 2 時間 55 分（前述の混合液をリアクター内に満たす）、好気準備運転 3 分（濃縮液の再貯留）、以上の 4 工程を 1 サイクルとして運転を行った。この浄化センターの流入下水は一般的な都市下水と比べて、硫酸イオン濃度が $400 \sim 600 \text{ mgSO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ と 10 倍程度高く、一方で、リン濃度は $1 \sim 2 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$ と比較的希薄という性質があった。リン除去回収 DHS リアクターの好気運転時のリン除去・濃縮性能は、図 12 に示した通りである。好気運転時では、多少の変動はあるものの運転全期間を通してリン除去が進行していたことが見てとれる（図 12 上）。リン濃縮液については、運転 30 日目以降において流入リン濃度の 10 倍以上の当たる $30 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度の濃縮が確認された（図 12 下）。しかしながら、運転 80 日目付近からリン濃縮性能は急激に悪化して、運転 270 日目以降に再び上昇するまでの間、リン濃縮は全く見られなかった。この期間中に、①濃縮液循環 DHS リアクターの設置、②嫌気運転開始時の攪拌工程の追加、③嫌気運転条件の変更、の3点について改善を行った。

①濃縮液循環 DHS リアクターの設置:リン濃縮がみられなくなった運転 90 日目以降、濃縮液中に多量の黒色固形物が観察されるようになり、また、嫌気運転時および濃縮液槽内で硫酸還元反応が卓越して進行している可能性が強く示された。これを受けて、硫酸還元反応の抑制するた

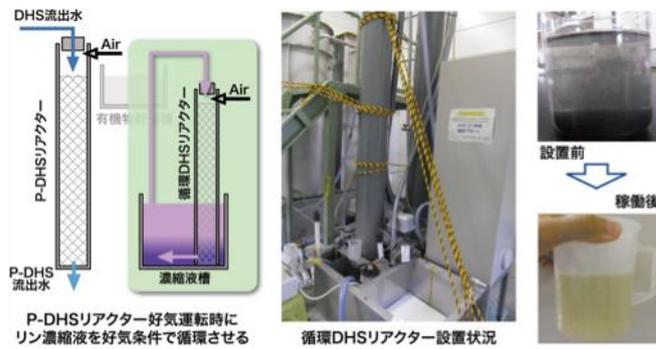


図13 濃縮液槽に設置した循環 DHSリアクターの概要図(左)と、実際の設置状況の写真(中央)および、濃縮液の視覚的状態の写真(右上、設置前; 右下、稼働後)。

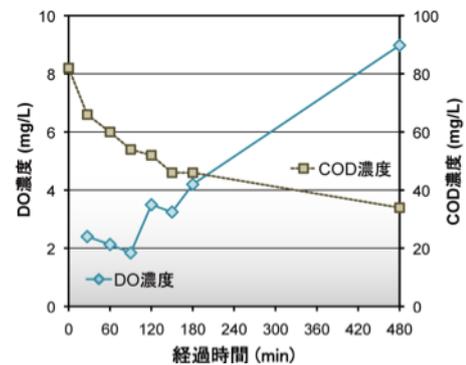


図14 循環 DHS リアクター稼働後の濃縮液槽内の DO 濃度と COD 濃度のプロファイル。

めに濃縮液を好気環境下にして残存有機物の除去を目的とした、循環 DHSリアクターを設置した(図13)。この DHS リアクターはスポンジ担体を有効容積 11.2 L で充填しており、60 L の貯留されたリン濃縮液を9時間(リン除去・回収 DHSリアクターの好気運転時間と一致する)かけて処理する(HRT: 1.7時間)仕様とした。循環 DHSリアクターが稼働してまもなく、濃縮槽内の黒色沈殿物の大部分は除去され、透明度の高い濃縮液を得ることができた(濃縮液の精製を達成)(図13右)。また、循環 DHS リアクター稼働後は、濃縮液槽内の DO 濃度の上昇および COD 濃度の減少がプロファイル結果から確認されており(図14)、濃縮液の好気処理が達成されていることが示された。

②嫌気運転開始時の攪拌工程の追加:リン濃縮性能の向上がみられない原因究明として、リン除去・回収 DHS リアクターに対して行った多くのプロファイル測定の結果より、嫌気運転開始時に投入した有機物が高さ方向で濃度勾配を形成しており、リアクター全体が有効に機能していない可能性が示された。そこで、嫌気準備運転時に投入した有機物の攪拌工程を追加したところ、攪拌工程後におけるリアクター内の COD 濃度は以前より設定値に近い値となり、リアクター内に均一に有機物が供給されるようになったことが示された(図15)。

③嫌気運転条件の変更:嫌気運転時間におけるリン除去・回収リアクター内の DO 濃度および

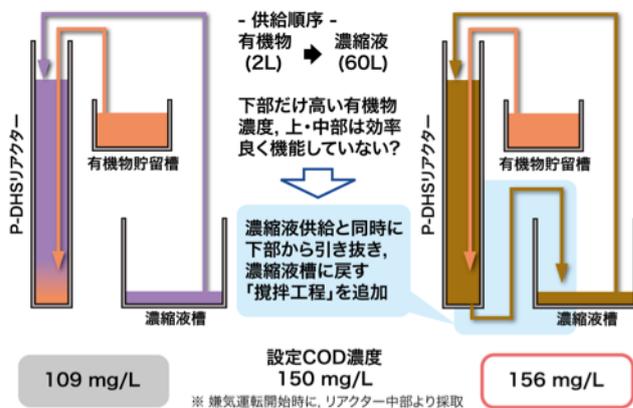


図15 嫌気運転開始時に追加した投入有機物攪拌工程の説明図。攪拌工程追加後(右側)では、追加前(左側)よりも設定値に近い COD 濃度調整ができた。

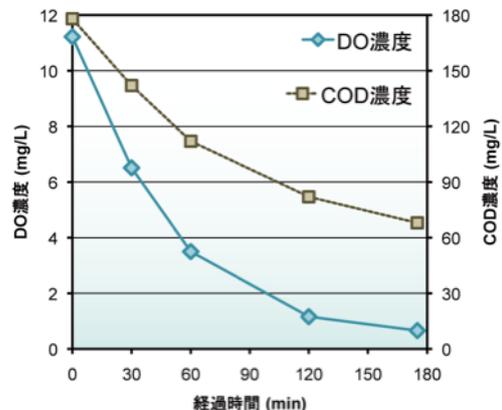


図16 嫌気運転時のリン除去・回収 DHS リアクター内の DO 濃度および COD 濃度の経時変化。

COD 濃度のプロファイル結果より、嫌気運転終了時においても $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 近い溶存酸素が残存しており、嫌気条件になっていないことが示された (図 16)。そこで、十分な嫌気条件の確保のために、嫌気運転時間を3時間から4時間に延長し、また、投入有機物量も1.5倍に増やした。その結果、運転 260 日目付近から濃縮液中のリン濃度に上昇傾向がみられ (図 14)、その後 $30\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度までのリン濃縮が確認された。

2.2.5.3 研究成果

パイロット規模のリン除去・回収 DHS リアクターを用いた実下水からのリン回収実証試験より、実用化に向けたリン除去・回収性能を向上させるノウハウの蓄積と運転・操作方法が確立できた。①リン濃縮液の好気処理の必要性: 本実験では循環 DHS リアクターを濃縮液槽内に設置することで対応した。濃縮液中の固形成分の除去に効果があった他、残存有機物の除去により、PAOs の生育を阻害する硫酸還元反応とその原因細菌である硫酸還元菌の増殖を低減できたと考えられる。②嫌気運転開始時における投入有機物の攪拌工程の追加: リアクター高さ方向に生じていた有機物濃度勾配が解消され、これまで設定有機物濃度よりも希薄であったリアクター上～中部におけるリン接収・放出性能が改善されたと考えられる。③十分な嫌気運転時間の確保のための生物膜の剥離除去: 嫌気運転時のプロファイル結果では、COD 濃度の減少に比べて DO 濃度の減少速度が極めて緩慢であることも示された (図 16)。このような現象は、濃縮液で満たされたリアクター内部で酸素供給が行われる以外に起こりえないことから、生物量が増えて肥大化したリアクター内の担体に空気がトラップされている可能性が強く示唆された。この対策としては、嫌気準備運転時にも空気供給を続けて、バブリングにより肥大化した生物膜を剥離させることを考えている。適切な生物膜厚さを保つことがリン除去・回収性能の維持・向上には必須であるといえる。

また、室内実験結果より、リン濃度の大小によって優占する PAOs の種類が異なることがわかった。それぞれの PAOs の特性を明らかにできれば、希薄なリン含有排水 ($< 1\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$) からリン濃縮を経て ($< 100\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$)、その濃縮液を更にリン濃縮させる二段階リン濃縮プロセスにより、計算上は $700\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上の超高濃度リン含有水を得ることも可能であることが明らかになった。

2.2.6 参考文献

- (1) Lelieveld, J.; Crutzen, P. J.; Dentener, F. J. *Tellus* 1998, 50, 128-150.
- (2) 福永栄、永井清、河野哲郎. 第31回下水道研究発表会講演集 1994、851-853.
- (3) Megm, S. R.; Knowles, R. *Biology and Fertility of Soils* 1987, 4, 205-212.
- (4) Raghoebarsing, A. A.; Pol, A.; van de Pas-Schoonen, K. T.; Smolders, A. J. P.; Ettwig, K. F.; Rijpstra, W. I. C.; Schouten, S.; Damste, J. S. S.; Op den Camp, H. J. M.; Jetten, M. S. M.; Strous, M. *Nature* 2006, 440, 918-921.
- (5) Kampschreur, M. J.; Temmink, H.; Kleerebezem, R.; Jetten, M. S. M.; Loosdrecht, C. M. v. M. *Water Research* 2009, In Press.
- (6) 加藤文隆、大下和徹、高岡昌輝、武田信生、松本忠生、檜物良一. 土木学会論文集 G、

2006, 27-40.

年度毎の特許、論文、外部発表等（件数）

広島大学

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

| 区分 年度 | 特許出願 | | | 論文 | | その他外部発表 （プレス発表 等） |
|----------|------|----|--------|------|-----|-------------------------|
| | 国内 | 外国 | PCT※出願 | 査読付き | その他 | |
| H20FY | 1件 | | | 2件 | | 12件 |
| H21FY | | | | | 1件 | 7件 |
| H22FY | | | | 1件 | | 10件 |
| H23FY | | | | 1件 | | 5件 |

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

2.3 バイオフィルム工学による微生物デザイン化

(北海道大学大学院地球環境科学研究院)

2-3-1 研究開発目的

微生物の自然存在形態ともいえるバイオフィルムの形成という視点から複合微生物系における微生物間相互作用を理解し、さらにこれを制御すること（バイオフィルム工学）によって廃棄物処理あるいは物質生産システムを効率化・安定化するための技術基盤を開発する（森川正章，2008；Morikawa，2006）。ここで、バイオフィルムとは固体表面あるいは界面に付着した微生物細胞が形成する高次構造体を指す。バイオフィルム内では細胞間や表層に蓄積するマトリクスと呼ばれる細胞外高分子が糊やシェルターの役割を果たし、細胞の快適な環境を守っている（Watnick & Kolter，2000；図1）。

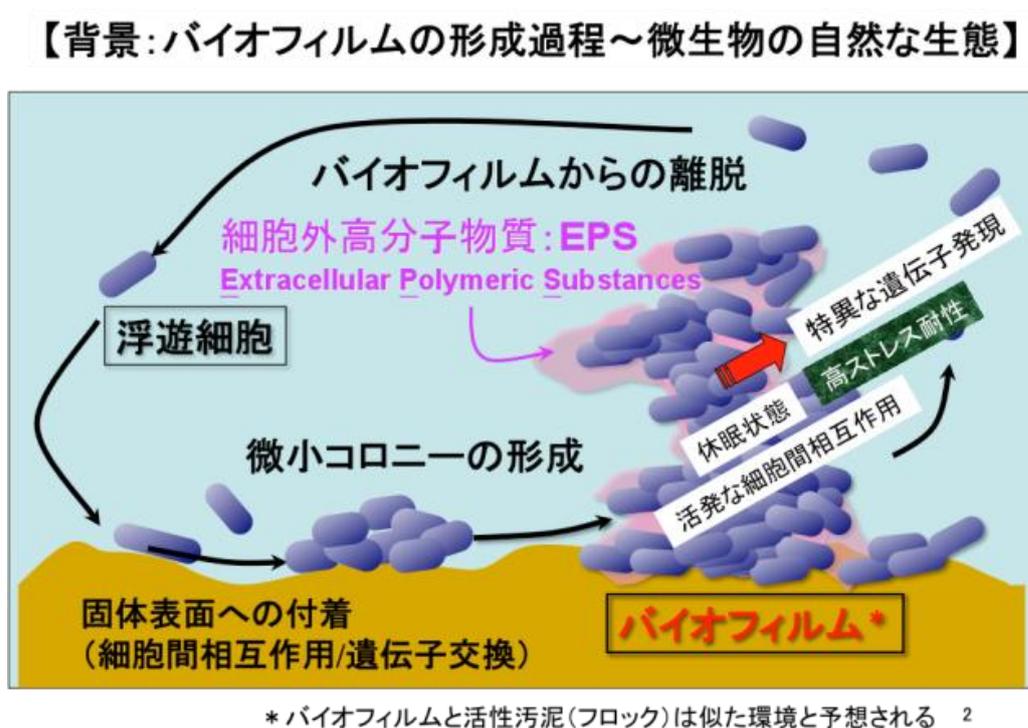


図 1

項目1．バイオフィルム工学による活性汚泥法の効率化・安定化を目指す。具体的には硝化槽の性能の鍵となるアンモニア酸化細菌についてその特性をバイオフィルム形成の視点から理解し、バイオフィルム形成による安定化を目指す。

また次世代の水処理システムとして期待される嫌氣的アンモニア酸化法において中心的な役割を果たす Anammox 菌についてもバイオフィルム工学的手法を適用しその特性の理解

と安定化を目指す。

項目 2. 偏在する環境汚染物質として炭化水素類を取り上げ、その分解細菌群の汚染現場への安定的な導入法の技術基盤をバイオフィルム工学の視点から開発する。

項目 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および現場への導入法を開発する。ここでいう「デザイン化」とは「複合微生物系を単純化してその要素を理解し、合理的に部分再構築して生物反応の効率化をはかる技術」を指す。

2-3-2 研究開発方針

研究開発は概ね以下の基本方針に沿って推進した。

1) バイオフィルム形成条件検討

窒素処理および炭化水素類の分解を担う主要細菌について、細菌自身及びそれを取りまく細菌群との細胞間相互作用について調べると同時に、バイオフィルム形成条件を検討する。

2) 単独バイオフィルムの性能検討

窒素処理および炭化水素類の分解に関与する細菌が形成する単独バイオフィルムの性能を浮遊細胞と比較し、バイオフィルムの優位性を検証する。

3) 汚泥中の微生物の単離

汚泥からさまざまな条件で構成微生物を単離する。単離した微生物と窒素処理に関与する細菌の混合バイオフィルムを形成させ、排他的あるいは協調的な微生物間の相互作用をもつものを選抜する。そこで得られるより安定な複合バイオフィルムについて環境耐性を評価する。

4) 微生物間相互作用の探索

3) で選抜した微生物の組み合わせ及び炭化水素類分解細菌による複合バイオフィルム形成において機能する活性シグナル分子を特定し、その構造を決定する。

2-3-3 研究開発の詳細内容及び成果

項目 1-1 硝化槽におけるアンモニア酸化細菌群のデザイン化:バイオフィルム工学による活性促進技術の開発 -活性汚泥疑似環境における活性化機構-

項目 1 では、活性汚泥法の効率化・安定化を目指した。具体的には硝化槽の性能の鍵となる好氣的アンモニア酸化細菌について、バイオフィルム化による影響ならびに活性汚泥中で共存する従属栄養細菌群による影響を明らかにし、これらを最適化することによって硝化槽微生物群をデザイン化し、硝化槽のアンモニア処理効率化および安定化を目指した。

バイオフィームと活性汚泥フロックは微生物細胞が高密度に凝集している点において類似した環境といえる。そこで先ず、複合微生物凝集体である活性汚泥による窒素処理で中心的な役割を担うアンモニア酸化細菌の本質をバイオフィーム形成の視点から理解した。具体的には、アンモニア酸化細菌標準株 (*Nitrosomonas europaea* IFO14298 : 以下 AOB) の純粋培養系を使ってバイオフィームを形成させ、そのアンモニア酸化活性を浮遊細胞と比較した。種々の材質固体を試した結果、ケイ酸・石英ガラスやポリプロピレンあるいはポリスチレンなどのプラスチック樹脂類に AOB は付着しないこと、ケイ酸カルシウム (コンクリート) 系担体にはよく付着してバイオフィームを形成することを見出した (図 2)。

【項目 1-1: アンモニア酸化細菌群のデザイン化 1】

AOB の純粋バイオフィーム化に成功し、アンモニア酸化活性が 30%程度向上することを確認した

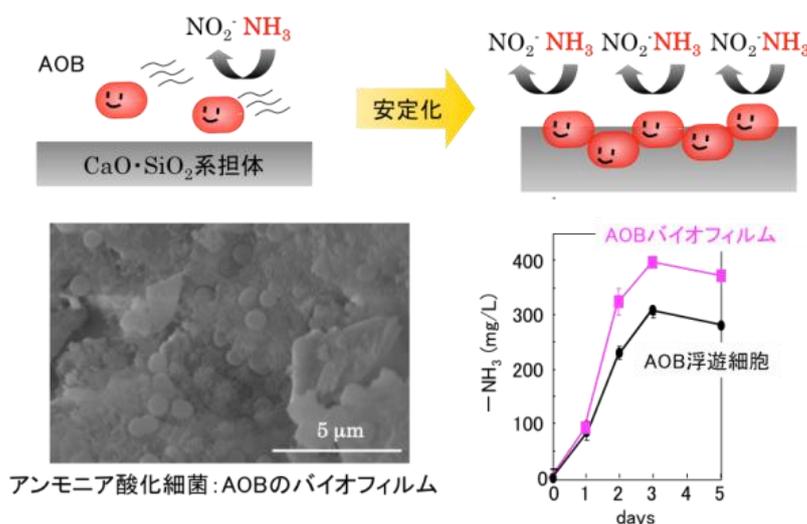


図 2

これまでに活性汚泥の包括固定あるいは結合固定の例はあるが、AOB 単独で明確なバイオフィームを形成させた例はない (Hashimoto & Furukawa, 1987; Isaka et al., 2008)。次に、AOB のバイオフィームと浮遊細胞状態のアンモニア酸化活性を比較したところ、バイオフィームの方が 2~3 倍比活性が高いことが判明した。一般にバイオフィームは休眠細胞を多く含むため、細胞活性が低下する報告例が多いなかで今回、大変興味深い結果が得られた。さらに、定量 PCR 法によってアンモニア酸化反応に関わる主要遺伝子の発現量 (mRNA 転写量) を測定したところ、初発段階のアンモニア酸化酵素 (AMO) ではなく第二段階のヒドロキシルアミン酸化還元酵素 (HAO) の遺伝子転写量がバイオフィームで約 25 倍も上昇するという全く新しい知見を得た。以上、AOB のバイオフィーム化によってアンモニア処理の 2~3 倍効率化を実現し、その機構に関わる新しい遺伝子発現調節の存在を明らかにした。

項目 1-2 硝化槽におけるアンモニア酸化細菌群のデザイン化: 従属栄養細菌群との相互作用を利用した好氣的アンモニア酸化細菌の活性促進技術の開発 - 活性汚泥内の未知相互作用の解析 -

本研究開発項目では、AOB と従属栄養細菌との新たな共生関係を利用した活性促進技術の基盤開発を行なった。これまで、AOB と従属栄養細菌との共生関係については、亜硝酸を介した脱窒菌との栄養共生が広く知られているのみである (Uemoto & Saiki, 1996)。すなわち、活性汚泥から約 100 種類の従属栄養細菌を単離し、それぞれ混合培養することによって AOB への影響を評価した。その結果、*Rheinheimera* 属細菌の一種である MR3 が AOB の活性を約 30% 向上させることが判明した。これまでに AOB と従属栄養細菌との共生については脱窒菌による亜硝酸除去作用が知られているが、MR3 には脱窒活性はなく、アンモニア消費活性もなかった。一方、MR3 をゲル包括固定 (日立プラントエンジニアリング社法) しても AOB の活性を促進することが判り、MR3 が活性促進因子を細胞外に分泌していることが示唆された。そこで、MR3 の培養上清を HPLC 分析したところ、これまで AOB が利用できるとされているグルタミンなどのアミノ酸類は含まないことが判った。現在、この未知ピーク成分について構造を解析中である。

一方、項目 1-1 で作製した AOB バイオフィームに MR3 や同属細菌 *R. aquimaris* JCM14331 を混合して培養したところ、アンモニア酸化活性がさらに 2~3 倍向上することが判った (図 3)。

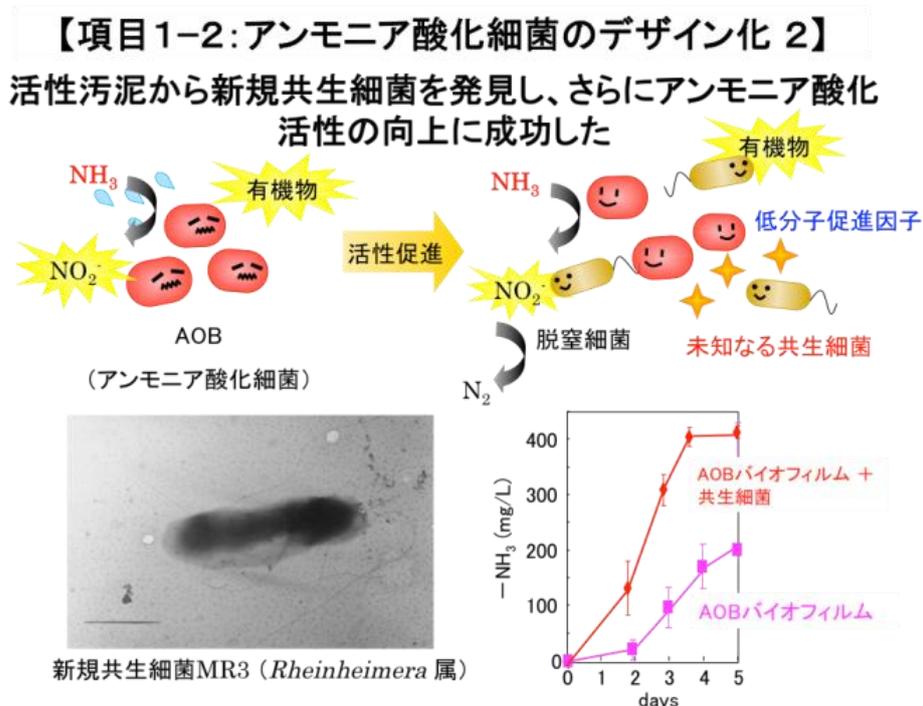


図 3

以上の結果から、AOB をバイオフィーム化し、さらに活性汚泥細菌 (*Rheinheimera* 属) を共存

させること（微生物群デザイン化）によって、アンモニア処理活性を格段に上昇させることに成功した。さらに、極めて複雑な微生物相互作用が繰り返される活性汚泥内：ブラックボックスでの AOB の生理学的特性を理解するために必要な基礎的知見を得ることができた。

項目 1-3 Anammox リアクターにおける微生物デザイン化：嫌気的アンモニア酸化細菌 (Anammox 細菌) の生理学的諸特性の解析と活性の促進 -Anammox 細菌の膜タンパク質解析-

Anammox 細菌のグラニュール化の促進とリアクター立ち上がり期間を短縮することを最終目標として、Anammox 細菌の特異な生理学的特徴であるグラニュール形成（バイオフィーム形成と類似と仮定）や窒素代謝に関する分子機構を解析した。

Anammox 細菌として *Candidatus Brocadia Sinica*（北海道大学工学研究科岡部研究室より提供）を対象とした。Anammox 細菌は細胞内にアナモキシソームと呼ばれる特殊な膜脂質で包まれた小器官を有し、窒素代謝で重要な役割を果たすことが知られている。そこで、*Ca. B. sinica* が 90% 以上優先化したグラニュールをガラスビーズで破碎し、超遠心分離により細胞の膜画分と可溶性画分を分画した。それぞれを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質解析したところ、膜画分に著量発現する 3 種類のタンパク質（P35, P45, P90）を見出した。それぞれ、ゲルから抽出して部分アミノ酸配列を決定したところ、窒素代謝で重要な酵素ヒドラジンヒドロラーゼのサブユニットであることが判った（図 4）。

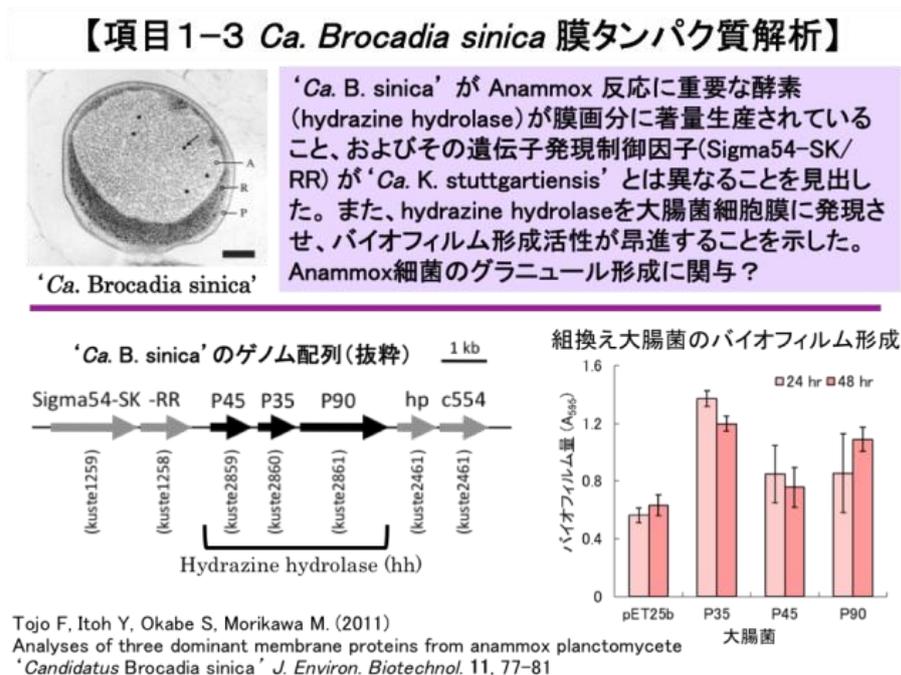


図 4

同酵素は別の Anammox 細菌 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* ではアナモキシソームの可溶性タンパク質として報告されており、本細菌とは異なる。さらに、*Ca. B. sinica* ゲノム情

報解析の結果から、これらのタンパク質遺伝子群はひとつの遺伝子クラスターを形成し、その上流には窒素飢餓に応答する Sigma-54 因子依存型の二成分制御系が存在していた。さらに興味深いことに、この二成分制御系は *Ca. K. stuttgartiensis* とは違うタイプ、すなわち *Candidatus Brocadia Sinica* に固有のものであった。次に、P35, P45, P90 の遺伝子をそれぞれ大腸菌で発現させた結果、バイオフィーム形成活性が 20~50% 上昇することが明らかとなった。これはアナモキシソームを持たない大腸菌では P35, P45, P90 が細胞質膜に局在して細胞の凝集や付着活性に影響を及ぼすことを示す結果である。これはアナモキシソーム膜タンパク質を大腸菌で発現した初めての成果である (Tojo et al., 2011)。

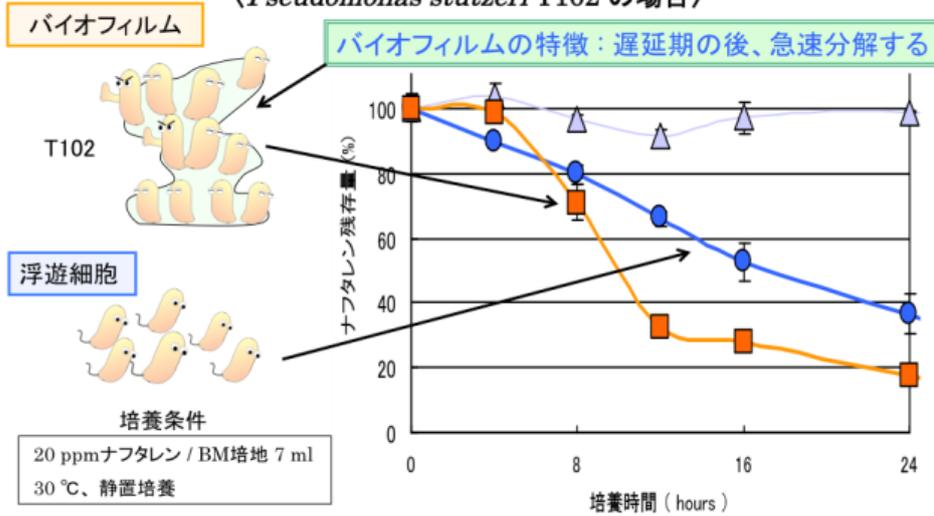
項目 2 炭化水素分解細菌のデザイン化: 炭化水素化合物汚染土壌浄化技術の効率化 -炭化水素分解細菌バイオフィームの実証試験-

野外の汚染土壌現場で汚染物質分解細菌を投入して汚染浄化する際の処理効率を決定するのは細菌の活性発現と定着率である。バイオフィームの形成は環境微生物の生存戦略の一つとして知られており、バイオフィーム内の細胞の多くは休眠状態となり温度、pH、化学物質など様々なストレスや生存競争に対する抵抗性が向上することが知られている。そこで本研究開発項目では炭化水素分解細菌をあらかじめバイオフィーム化してから汚染土壌に投入することで細菌の定着率を向上させ、従来の環境修復技術よりも効率的かつ安定的な環境修復が行える可能性について検討した。

研究室所有の石油系炭化水素分解細菌 7 種についてポリプロピレンやケイ酸ガラスにおけるバイオフィーム形成能を調べた。その結果、ナフタレンやジベンゾチオフェンなどの芳香族炭化水素類を分解する *Pseudomonas stutzeri* T102 が最も良好なバイオフィームを形成した。次に T102 のナフタレン分解活性を経時的に調べたところ、浮遊細胞では培養直後からゆるやかに分解が開始するのに対して、バイオフィーム細胞では分解開始までに 4 時間程度の準備期 (lag time) が必要であった。しかし、4 時間後以降は速やかな分解が見られ、ナフタレン 20 ppm の 70% を分解するのに要する時間は浮遊細胞では 28 時間かかったのに対してバイオフィーム細胞では 12 時間程度であった (図 5)。

【項目2:原油汚染土壌浄化細菌 T102のデザイン化】 〈バイオフィルムと浮遊細胞のナフタレン分解活性比較〉

〈*Pseudomonas stutzeri* T102 の場合〉

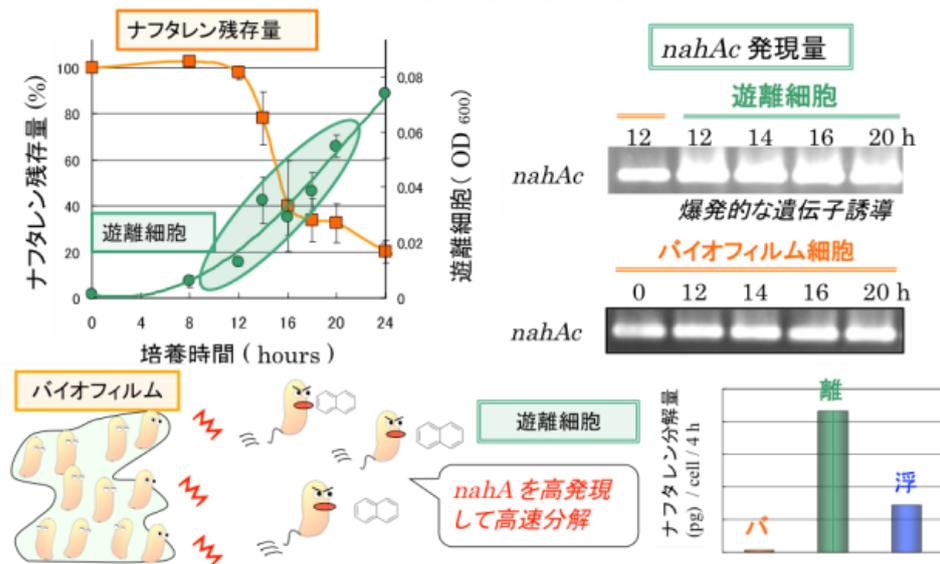


バイオフィルムと浮遊細胞では T102のナフタレン分解特性が異なる

図 5

このことから、バイオフィルム細胞は分解開始まで時間を要するものの一旦分解が始まると高速でナフタレンを分解できる特性を有するという興味深い特性を有することが明らかになった。そこで、その原因を探求したところ、バイオフィルムから遊離してくる細胞がナフタレン分解酵素遺伝子を爆発的に発現していることが判った (図 6)。

〈バイオフィルムと遊離細胞のナフタレン分解遺伝子比較〉



ナフタレン急速分解は、バイオフィルムから遊離した高活性細胞に由来する

図 6

さらに48時間後の生菌数（CFU: colony forming units）は浮遊細胞に比べてバイオフィルム細胞の方が2倍程度高いことが分かった。次に実際の原油汚染土壌を用いてバイオフィルムの効果を検証した。北海道石狩油田跡地では現在も油井からにじみ出した原油が地表に漏出し続けている。そこで、この原油汚染土壌を採取し T102 を浮遊細胞あるいはバイオフィルム細胞状態で投入した際の定着率を比較した。まず、あらかじめ静置培養によって培養ガラス瓶内壁にバイオフィルムを形成させた。次に汚染土壌を入れ強く攪拌し、ガラス瓶内壁からバイオフィルムを剥離し土壌中に分散させた。また対照実験として振とう培養した浮遊細胞培養液を汚染土壌に添加した。この際に生菌数は同じになるよう調整した。これら2通りの方法により汚染土壌に投入した T102 株の定着率を9週間にわたり比較した。定着細胞数は16S rRNA 遺伝子を鋳型とした PCR 増幅 DNA を DGGE (detergent density gradient gel electrophoresis) 法で分析し、SYBR green により染色された DNA バンドの濃淡をデンストグラフで定量した。その結果、バイオフィルムの方が定着性は高く、9週間後においても T102 のバンドが確認できた（図7）。

〈T102 導入実汚染土壌の菌叢解析 16SrRNA-rtPCR-DGGE〉

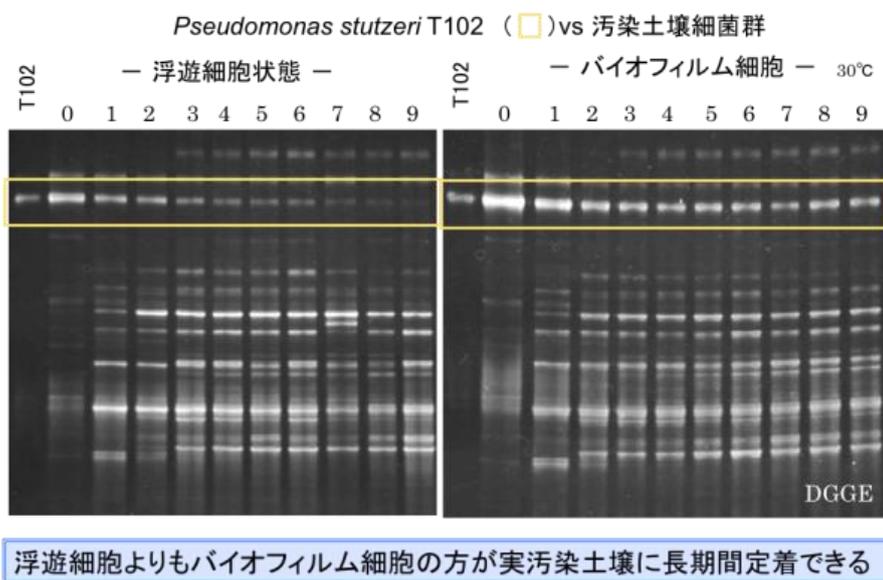
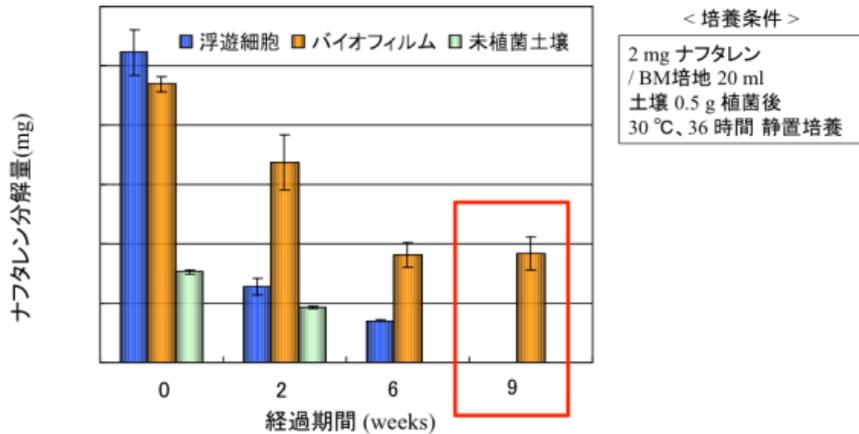


図 7

さらに T102 バイオフィルムを含む土壌は9週間後においてもナフタレン分解活性を維持していることを確認した（図8）。

〈T102を導入した実汚染土壌のナフタレン分解活性比較〉



T102 バイオフィーム保有土壌はナフタレン分解活性を長期間維持する

図 8

以上、ナフタレン分解細菌をバイオフィーム化することで分解持続性を大幅に拡大（効率化）することに成功した。

また、バイオフィームの高分解活性持続性の要因は「高い環境耐性」と「高活性細胞の放出」であった。つまり、バイオフィームは高性能な戦闘機をつぎつぎに発射する頑強な空母のような機能を果たすことを発見した (Shimada et al., 2012)。

項目 3 植物—根圏細菌群のデザイン化：炭化水素化合物汚染水浄化技術の効率化 -水生植物-根圏細菌共生作用の解明と根圏バイオフィーム工学-

微生物環境浄化技術の実施例において汚染現場での微生物定着率の低さ、分解活性の低下に加えて栄養源や外来微生物の投入による新たな二次汚染発生の危険性といった問題も指摘されている。これらの問題を一挙に解決する方法として、本研究項目では植物と微生物の協働を利用した新しいバイオレメディエーション技術の開発を目指した。植物の根の周囲を根圏と呼ぶ。根圏では植物代謝により生成される糖、アミノ酸等の有機物、および酸素が豊富に存在する。微生物はこれらを求めて根圏へ集積し、増殖や代謝を促進する (Badri et al., 2009)。つまり、根圏では外部から栄養源や酸素を投入しなくても、汚染物質分解微生物の増殖や代謝能力を持続的に発揮させることが可能となる。さらに植物体へ強く付着し、植物に依存して増殖する分解微生物を用いることができれば、浄化後に植物体と共に現場から除去することで二次汚染を回避できると考えられる。すなわち、本研究開発項目では植物と根圏細菌の共生作用を利用した根圏微生物群集のデザイン化を実現し、その有効性について実

証することを目標とした。

対象汚染物質として石油系モデル炭化水素（フェノール、ナフタレン、原油）を用いた。供試水生植物は、北大植物園より採取したアオウキクサ *Lemna aoukikusa* を使用した。アオウキクサと共存する根圏微生物を、各炭化水素を含む培地で1週間集積培養した後、根表面から遊離させ寒天平板法により単離した。単離した細菌のうち、各炭化水素を単一炭素源とした培地で生育可能でコロニー形態の異なる細菌をそれぞれ109菌株（フェノール）、79菌株（ナフタレン）、41菌株（原油）取得した。高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーを用いてこれら菌株の炭化水素分解能を確認した。

なかでも特に、*Pseudomonas* sp. P2 および *Acinetobacter calcoaceticus* P23 は優れたフェノール分解活性を有すると共に、約90%もの細胞がアオウキウサ根へ強く付着することを見出した（図9）。

〈除菌ウキクサへの根圏細菌再付着の様子〉

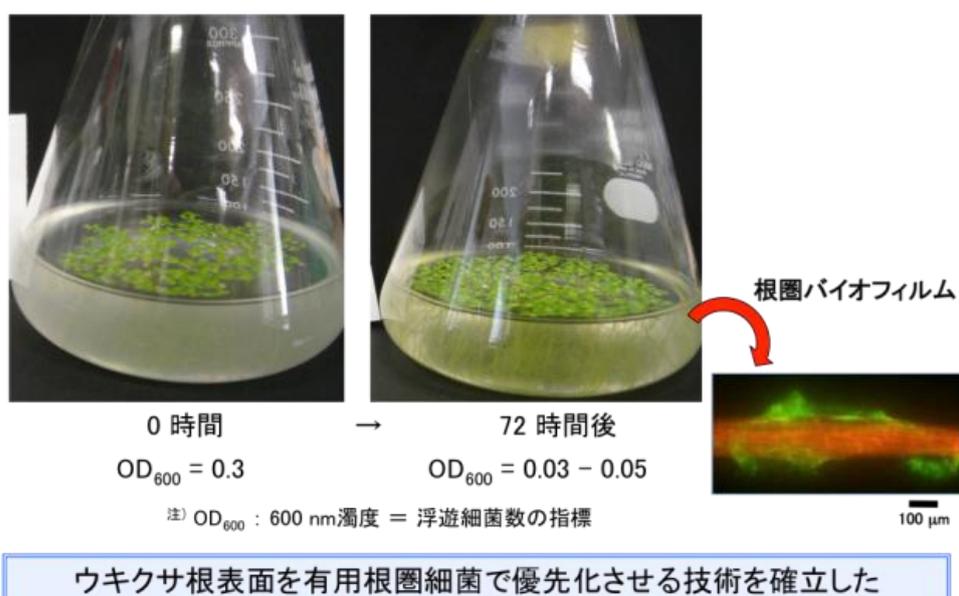


図 9

次にアオウキウサ根表面を蛍光顕微鏡で観察したところ、P2 は非常に厚いバイオフィームを形成したのに対して、P23 が形成するバイオフィームは比較的薄いものであった。アオウキクサ表面に形成された P23 バイオフィームを遊離させて計測したところ、ウキクサ 1 株あたり最大 10⁸ の細菌が付着していた（図10）。

〈P2 と P23のアオウキクサ根圏バイオフィルムの違い〉

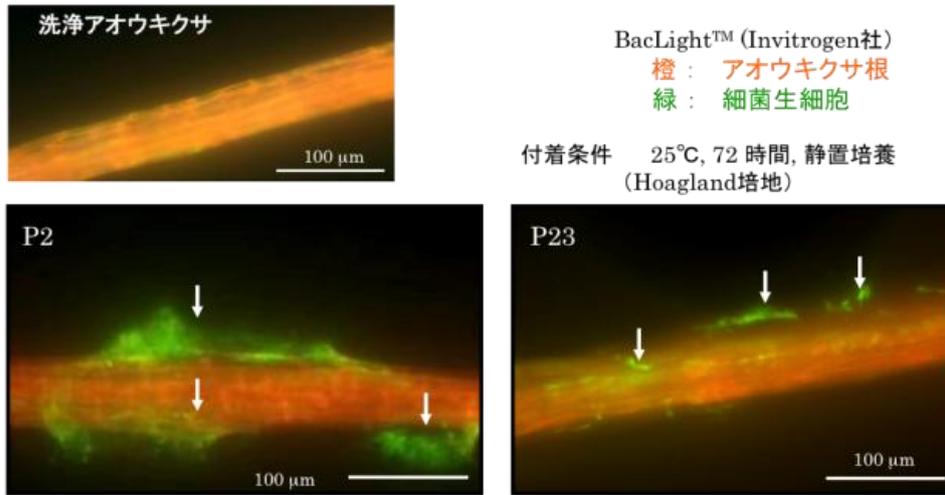


図 10

続いて、アオウキウサ根表面に形成した P23 バイオフィルムのフェノール分解特性を洗淨前のアオウキウサ（根圏細菌あり）および洗淨アオウキウサ（根圏細菌なし）と比較した。それぞれの培養フラスコに 40 ppm のフェノールを 0、40、96 時間後に添加したところ、P23 付着アオウキウサのみ、フェノール分解活性は 160 時間以上持続した（図 11）。

〈P23付着アオウキクサのフェノール分解持続性〉

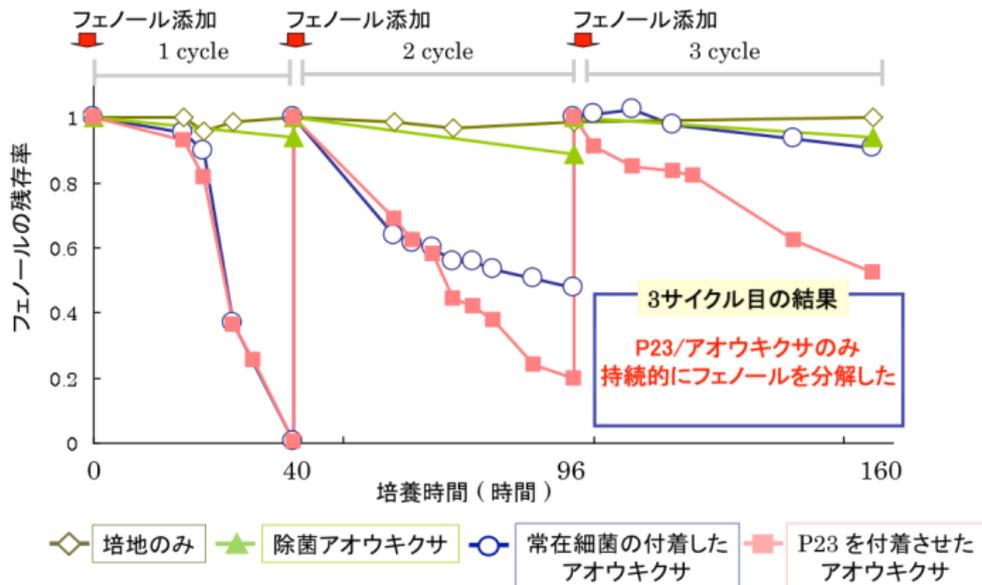


図 11

常在細菌が付着した野生ウキクサでフェノール分解活性が低下した理由は、共存する多数の根圏細菌との生存競争により淘汰されたものと思われる。

ここでさらに興味深いことに、P23 が根表面にバイオフィルムを形成しているアオウキウサは洗浄アオウキウサに比べて約 1.6 倍の生育速度（葉状体の数の増加）を有していることを発見した。これはアオウキウサの生育促進根圏として世界初の報告である（Yamaga et al., 2010）。

以上の成果をまとめて特許出願した（特開 2009-247279 「新規水草根圏微生物」）。

2-3-4 参考文献

Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM. (2009)

Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions.
Curr. Opin. Biotechnol. 20(6), 642-650.

Hashimoto S, Furukawa K. (1987)

Immobilization of activated sludge by PVA-boric acid method.
Biotechnol. Bioeng. 30(1), 52-59.

Isaka K, Date Y, Sumino T, Tsuneda S. (2007)

Ammonium removal performance of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier: anammox bacteria immobilized in gel carrier.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 76(6), 1457-1465.

Morikawa M. (2006)

Beneficial biofilms formation by industrial bacteria, *B. subtilis* and related species.
J. Biosci. Bioeng. 101(1), 1-8

森川正章

バイオフィルムがもたらすブレイクスルーの可能性

ブッカーズ編「バイオフィルムの基礎と制御」 pp 389-399 (2008) (エヌティーエス)

Shimada K, Itoh Y, Washio K, Morikawa M. (2012)

Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms.
Chemosphere 87(3), 226-233

Tojo F, Itoh Y, Okabe S, Morikawa M. (2011)

Analyses of three dominant membrane proteins from anammox planctomycete Candidatus 'Brocadia sinica.'
J. Environ. Biotechnol. 11(1-2), 77-81

Uemoto H, Saiki H.

Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*.

Appl. Environ. Microbiol. 1996 Nov;62(11):4224-8.

Watnick P, Kolter R. (2000)

Biofilm, city of microbes.

J. Bacteriol. 182(10), 2675-2679.

Yamaga F, Washio K, Morikawa M. (2010)

Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*.

Environ. Sci. Technol. 44(16), 6470-6474

(年度ごとの特許、論文、外部発表等は添付書類を参照のこと)

IV-3 実用化の見通し

項目3について、以下の2つの可能性が考えられる。

ケース1：省エネルギー型高効率栄養塩除去システム

従来の嫌気好気の二槽式活性汚泥法では1立米あたりの電気などのエネルギー消費量は約800ワット時であるが、その後段処理の50%相当分を項目3で開発した植物-根圏細菌群デザイン化システム（新植生浄化ユニット）で置き換えた場合、同程度の水処理に要するエネルギーは300ワット時程度まで削減できると試算できる。さらに余剰植物体からのバイオエタノール生産で生成されるエネルギーはおよそ60ワット時と見積もる事ができ、これを併せると極めて経済性の高い水処理法が提供できるものと考えられる。ただし、その実現までには、新植生浄化ユニットの野外実証試験に加えて、植生浄化ユニットの構築および最適運転条件の策定あるいは既存排水処理施設の改造などが必要である。

ケース2：二次処理水の水質安定化

近年、ノニルフェノールやビスフェノールなどの内分泌攪乱物質やさまざまな難分解性化合物（POPs）が工場廃水に混入するリスクが増えている。すなわち、今後二次処理が必要な廃水は増えることが予想されその処理の必要性は高まるであろう。現在はオゾン処理などコストの嵩む方法が高度処理技術として用いられているが、項目3をさらに発展させてPOPsに対応できる新植生浄化ユニットが開発できれば、省エネ型の高度処理技術が提供できる可能性がある。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

北海道大学地球環境科学研究所

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

| 区分 年度 | 特許出願 | | | 論文 | | その他外部発表 (プレス発表 等) | 受賞実績 |
|----------|------|-----|------------|----------|-----|-------------------------|------|
| | 国内 | 外国 | PCT※出 願 | 査読付 き | その他 | | |
| 平成 19 年度 | 0 件 | 0 件 | 0 件 | 1 件 | 2 件 | 5 件 | 0 件 |
| 平成 20 年度 | 1 件 | 0 件 | 0 件 | 5 件 | 3 件 | 15 件 | 0 件 |
| 平成 21 年度 | 0 件 | 0 件 | 0 件 | 4 件 | 1 件 | 13 件 | 0 件 |
| 平成 22 年度 | 0 件 | 0 件 | 0 件 | 4 件 | 0 件 | 15 件 | 1 件 |
| 平成 23 年度 | 0 件 | 0 件 | 0 件 | 4 件 | 1 件 | 23 件 | 0 件 |

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

2.4 嫌気性アンモニア酸化プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発

(北海道大学工学研究院 岡部聡)

2.4.1 Anammoxプロセスの最適条件の検討

嫌気性アンモニア酸化 (anammox) プロセスは、嫌気条件下でアンモニアと亜硝酸から直接窒素ガスに変換する生物反応である。anammox プロセスは、従来の窒素除去プロセスである硝化脱窒法と比較して、酸素及び有機物の供給が不要、さらにこれらを供給するための電力、薬品、また有機物から発生する余剰汚泥量の低減などの特長を有しており、大幅なランニングコストの削減が期待されている。しかし、anammox 細菌は難培養性の絶対嫌気性細菌であり、増殖速度が極めて遅く集積培養が非常に困難であるため、anammox 細菌の生理・生態に関する知見は極めて少ない。

これまでに著者らは、real-time PCR 法を用いた anammox 細菌の迅速な定量方法・検出方法を開発し、植種汚泥として最も適した汚泥を選択することを可能とした¹⁾。さらに、選択した適切な汚泥を不織布を生物膜担体とした上向流カラムリアクターに植種し連続運転を行うことにより、anammox 細菌の効率的な集積培養に成功した²⁾。上向流カラムリアクター全体として、高い窒素除去速度は達成できたが、リアクター後半部では anammox 細菌が十分に存在するにもかかわらず、anammox 反応がほとんど生じていないことが明らかになった³⁾。この理由として、anammox 細菌は pH の上昇により活性阻害を受ける可能性があることが指摘されていることより、著者らのリアクターにおいても、リアクター後半部に存在する anammox 細菌は pH の上昇により阻害を受けた可能性が考えられる。

そこで本研究では、anammox リアクター内に廃水の流れ方向に棲み分けする微生物群集構造 (空間的配置) や活性をモニタリングし、リアクターを最適化することを目的とした。具体的には、リアクターへの基質流入方式を二段ステップ流入方式に切り替え、HRT を短縮することにより、リアクター後半部における pH 上昇の抑制を試みた。リアクター後半部における pH の上昇を抑制し、リアクター後半部における anammox 活性を高く維持することにより、リアクター全体としての処理能力の向上を図ることを目的とした。

2.4.1.1 Anammoxリアクターの処理効率の評価

本研究では、植種汚泥として本研究室で運転を行っている上向流型anammoxリアクター内のバイオマスを使用し、図1に示すようにポリエステル製の不織布を生物膜担体として充填した内径 26 mm、全長280 mm、容積150 mLのガラス製カラム型リアクターに人工無機培地を上向流にて連続供給した。約300日間運転を行い、anammox細菌の馴養を行った後、実験を開始した。本研究におけるanammoxリアクターの運転条件及び人工無機培地の構成を表 1に示す。本研究では、Phase 3、4、5、6において、基質流入管をリアクター中間部に挿入 (図 1) することにより、リアク

一前半部の流入口より流入する基質と同濃度、同流量の基質を二段ステップ方式で流入させ運転を行った。また、リアクター各部位での処理水を採取し、リアクターの各区分 (Zone A-Zone D) での処理性を評価した。anammox反応による窒素ガス生成時に生物膜担体からバイオマスが剥離することを最小限に抑制する目的でリアクターを45度斜めに設置した。NH₄⁺-N 及びNO₂⁻-N濃度はNH₄⁺-N : NO₂⁻-N = 1.2 : 1、KHCO₃濃度は500 mg/L、流入水pHは7.2±0.1 (塩酸により調整)、培養温度は37°Cに設定した。さらに、流出NO₂⁻-N濃度が50 mg/L、pHは流出水のpHが最適pHの上限である8.3以下になるようにそれぞれ調整した。また、培地作成時に窒素ガスで曝気し、溶存酸素 (DO) をDO計 (DO-5Z, KRK) で測定することにより0.1 mg/L以下にし、ヘッドスペースへ窒素ガスを約5分間置換することで培地を無酸素状態に保った。また、水理的滞留時間 (HRT) を0.1-1.6 hに設定した。リアクターの流入部及び流出部にはテフロン目皿を設置し、培地の容器にはガラス製で茶褐色細口共栓試薬瓶 (容積11 L, 23 L) を用い、気体の不透過性に優れているバイトン栓により蓋をした。さらに、窒素ガスを充填したアルミニウムバックを設置することで、培地が減少することにより生じるヘッドスペースへの酸素の混入を防いだ。チューブには気体の不透過性に優れているファーマドチューブ (PharMed BPT Tubing, MASTERFLEX, Illinois U.S.A) を使用し、培地交換時に毎回超音波洗浄を行った。

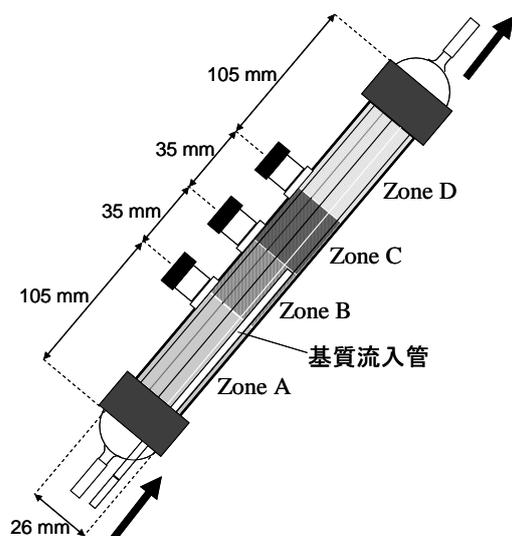


図1 本研究で用いたガラス製カラム型リアクター

表1 anammoxリアクターの運転条件

| | 運転期間 (day) | HRT (h) |
|---|------------|----------------------------|
| Phase 1 | 35 | 0.8 |
| Phase 2 | 9 | 1.6 |
| Phase 3 | 40 | 前半部; 1.6 後半部; 0.8 (ステップ流入) |
| Phase 4 | 15 | 前半部; 0.8 後半部; 0.4 (ステップ流入) |
| Phase 5 | 9 | 前半部; 0.4 後半部; 0.2 (ステップ流入) |
| Phase 6 | 16 | 前半部; 0.2 後半部; 0.1 (ステップ流入) |
| 無機合成培地 | [mg/L] | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 140-420 | |
| NaNO ₂ | 120-410 | |
| KHCO ₃ | 500 | |
| KH ₂ PO ₄ | 27 | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 300 | |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 180 | |
| 微量金属元素 (TES I, TES II) | | |
| 培養温度 | 37°C | |
| DO | 0.1 mg/L以下 | |
| 流入pH | 7.2±0.1 | |
| リアクター容積 | 150 mL | |

TES(Trace Element Solution) I

| | |
|--------------------------------------|----------|
| EDTA | 15 [g/L] |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 9.14 |

TES(Trace Element Solution) II

| | |
|--|----------|
| EDTA | 15 [g/L] |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.43 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.24 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.99 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.25 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.22 |
| NiCl ₂ ·6H ₂ O | 0.19 |
| Na ₂ SeO ₄ ·10H ₂ O | 0.21 |
| H ₃ BO ₃ | 0.0014 |

上向流カラムリアクターの処理性を評価するために、サンプルを 0.2 μm のメンブレンフィルター (DISMIC-13CP, ADVANTEC) で濾過後、イオンクロマトグラフ (DIONEX D-100、陽イオンカラム : IonPac CS3, DIONEX、陰イオンカラム : IonPac AS9-HC, DIONEX) を用いてリアクターの培地及び流出水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 及び $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 濃度を測定した。また、pH 計 (B-212, HORIBA) を用いてサンプルの pH を測定した。

(1) ステップ流入運転前における処理性

各Phaseにおける流入水中の平均 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度、及びHRTを図 2に、また、流入窒素負荷、窒素除去速度、及びHRTの経日変化、ならびに各Phaseにおけるリアクター各区間での平均窒素除去速度及び窒素除去に対する寄与率を図3に示す。さらに、流入水中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及び $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度は、anammox活性が良好な $\text{NH}_4^+\text{-N} : \text{NO}_2^-\text{-N} = 1.2 : 1$ になるように設定した。また、各Phaseにおける流入水中の基質濃度は、基質の枯渇を防ぐ目的で、流出水中の $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度が50 mg/L付近になるように計算して決定した。Phase 1においてHRTを0.8 hに固定し運転を行ったところ、窒素除去速度は安定的に推移し、平均窒素除去速度は $10.2 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ (平均窒素負荷; $17.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) であり、各区間における窒素除去への寄与率はそれぞれ73% (Zone A)、10% (Zone B)、3% (Zone C)、14% (Zone D) であった。これはリアクター体積比の38%に相当するZone Aにおいて7割以上の窒素が除去され、それ以降の部分では、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及び $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度が十分であったにも関わらずリアクターのパフォーマンスが著しく低下していることを示している。HRTを1.6 hに延長し流入窒素負荷を低下させたPhase 2では、平均窒素除去速度は $6.7 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ (平均窒素負荷; $10.3 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) とPhase 1に比べて減少した。

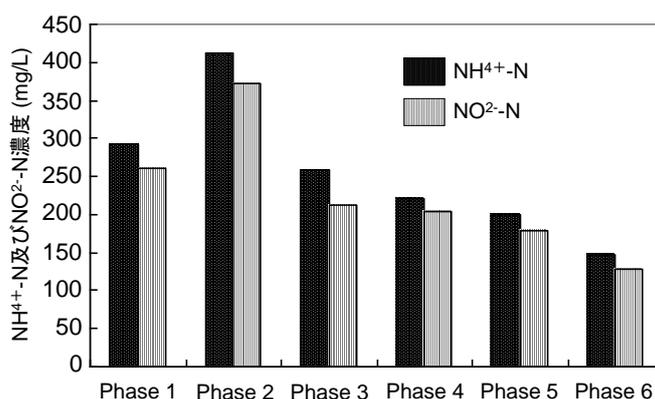


図 2 各Phaseにおける流入水中の平均 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度

(2) ステップ流入運転後における処理性

リアクターの運転開始 44 日目に、リアクターを二段ステップ流入方式に切り替え運転を行った。Phase 3 (前半部 HRT; 1.6 h、後半部 HRT; 0.8 h) でステップ流入方式導入後、HRT を段階的に

短縮していった。その結果、Phase 5 (前半部 HRT; 0.4 h、後半部 HRT; 0.2 h) では、リアクター後半部の anammox 活性が上昇し、それに伴いリアクター全体の平均窒素除去速度が $26.8 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ まで増加した(図 3)。また、Phase 5 においては、リアクター後半部 (Zone C + Zone D) はリアクター全体の窒素除去の 5 割以上に寄与していた。さらに HRT を短縮し窒素負荷を増加した Phase 6 において、窒素除去速度が最大の $31.2 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ を記録した。しかしながら、運転を継続するに伴い流出水中の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の上昇が確認され、窒素除去速度はこれ以上増加せず、リアクター全体の平均窒素除去速度は Phase 5 と同程度 ($26.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) であった。このことより、Phase 6 においてリアクター前半部及び後半部それぞれにおいて窒素除去速度は最大に達したと考えられる。

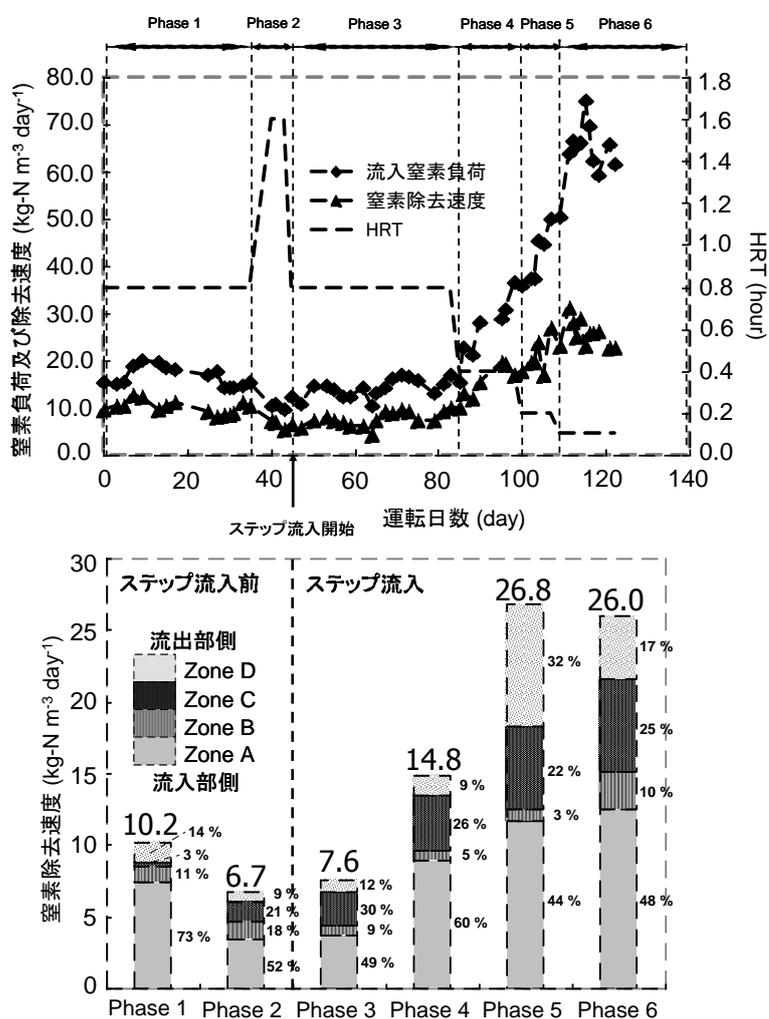


図 3 流入窒素負荷、窒素除去速度、及びHRTの経日変化、ならびに各Phaseにおけるリアクター各区間での平均窒素除去速度及び窒素除去に対する寄与率

(3) 流出水中の pH の変化

流入水のpHを 7.2 ± 0.1 に設定した場合の各Phaseにおける流出水の平均pHを図4に示す。ステップ流入を導入しHRTを段階的に短縮していくことによって、流出水の平均pHは減少していった。Phase 1において流出水の平均pHは8.2であったのに対し、リアクター前半部及び後半部のanammox活性の上昇が停滞したPhase 5以降では、流出水の平均pHは7.9 (Phase 5)、7.7 (Phase 6) に低下していた。既往の研究により、anammox細菌の活性はpH8.3以上で阻害されるという報告がある⁴⁾。著者らの既往の研究において、微小電極を用いて生物膜内のpH分布を測定した結果によると、anammox活性により生物膜内では最大0.5 pHユニット程度液本体よりも高いことが確認されている⁴⁾。従って、ステップ流入導入前のPhase 1及びPhase 2における生物膜内部においては、pHがanammox細菌の最適培養条件 (pH = 6.7 - 8.3) の上限値を大幅に上回っている可能性がある。以上より、流出水のpHの上昇が8.0以下に抑制されたことにより、リアクター後半部のanammox活性が上昇したと考えられる。

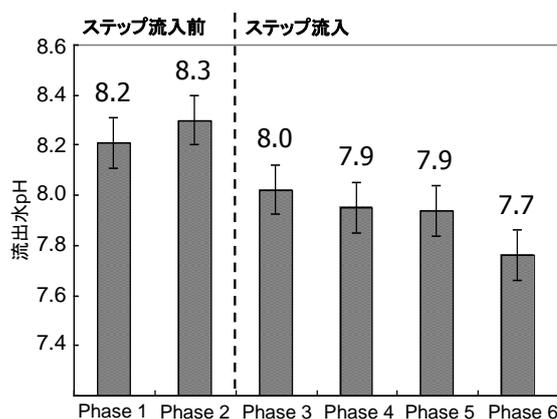


図4 流入水のpHを 7.2 ± 0.1 に設定した場合の各Phaseにおける流出水の平均pH

(4) 各区間におけるAnammox細菌の存在割合

バイオフィルムの切片化およびFISH法の手順は、Amann, 1995⁵⁾、Okabe et al., 1999⁶⁾の方法に準拠した。FISH法に用いた蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、全細菌に特異的なEUB338⁷⁾及び*Candidatus Brocadia anammoxidans* 特異的なAMX820⁸⁾の2種類である。本研究で用いたプローブは最新の16S rRNA sequencing databaseに基づくARB software package (<http://www.arb-home.de/>) のPROBE_DESIGN toolにより設計した。また、プローブの特異性はARB database により確認し、ハイブリダイゼーションの最適条件は実験により決定した。プローブはfluorescein isothiocyanate (FITC) またはtetramethylrhodamine 5-isothiocyanate (TRITC) で標識されたものを用いた。ハイブリダイゼーションは46°Cで3時間行い、その後48°Cで20分間洗浄を行った。ハイブリダイゼーションしたサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いて、波長488 nm (Arレーザー) と543 nm (HeNeレーザー) のレーザーでスキャンを行い観察した。

Phase 1 (リアクターの運転開始 5 日目) において、リアクター前半部 (Zone A)、中間部 (Zone B + Zone C)、及び後半部 (Zone D) のそれぞれの区間よりバイオマスを採取し FISH 法を行った。全細菌に特異的な配列を持つプローブ EUB338 及び *Candidatus Brocadia anammoxidans* に特異的な配列を持つプローブ AMX820 により蛍光標識し、EUB338 で標識された全細菌に占める AMX820 で標識された anammox 細菌の存在割合を算出した。その結果、ANAMMOX 細菌のリアクターの各区間での存在割合は、Zone A では 95%、Zone B 及び C では 94%、Zone D では 90% であり、anammox 細菌はどの区間においても極めて高い存在比で存在していた。

さらに、Phase 1 (リアクターの運転開始 5 日目) において、リアクター前半部 (Zone A) 及び後半部 (Zone D) のバイオマスを対象として、anammox 細菌に特異的なプライマーセット Pla46f 及び Univ1387r を用いて 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行うために、上向流カラムリアクターの前半部 (Zone A)、中間部 (Zone B + Zone C)、及び後半部 (Zone D) からそれぞれバイオマスサンプルを 3 つずつ採取し (前半部; 3.5 mL、中間部 2.0 mL、後半部 2.5 mL)、DNA 抽出を行うまで -80°C で冷凍保存した。その後、採取したサンプル 200 µL を Fast DNA Spin Kit (BIO101) を用いて DNA 抽出を行った。抽出された DNA は、Hofer DyNA Quant 200 (Amersham) を用いて濃度 (ng/µL) を測定した。抽出された DNA は -20°C で保存した。抽出された DNA を Sigma の *Taq* DNA polymerase と *Planctomycetals* 目及び全細菌に特異的なプライマーセット Pla46f⁹⁾ 及び Univ1387r¹⁰⁾ を用いて PCR 増幅を行った。PCR プログラムは初期変性が 94°C で 5 min、[94°C: 90 sec、62°C: 90sec、72°C : 1 min] × 25 サイクル、最後に 72°C で 4 min とした。得られた PCR 産物は 1% アガロース電気泳動で確認した。PCR 増幅断片は、Wizard PCR Minipreps DNA purification system (promega) を用いて精製後、pGEM-T vector cloning system (promega) を用いてトランスフォーメーションを行った。プラスミド DNA は Wizard Plus Minipreps DNA purification system (promega) を用いて回収・精製し、ほぼ 16S の全領域の塩基配列は ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) で決定した。得られた塩基配列は、BLAST を用いて相同性を比較した。また、CLUSTAL W パッケージを用いて Neighbour-Joining 法により系統樹を作成した。

系統解析の結果に基づいて作成した系統樹を **図 5** に示す。その結果、リアクター前半部及び後半部において、それぞれ検出頻度 73%、96% の割合で同種の anammox 細菌のクローンが検出された。また、検出された anammox 細菌のクローンは *Candidatus Brocadia anammoxidans* に対して約 92~96% の相同性を有しており、新種の anammox 細菌である可能性が示唆された。以上より、本リアクター内には単一種の anammox 細菌が一様に存在していることが示唆された。

以上の様に、本研究では、上向流型 anammox リアクターの窒素除去性能の評価を行った。リアクターを二段ステップ流入方式とし、HRT を適宜短縮して連続運転を行うことにより、リアクター後半部の pH 上昇を抑制し、anammox リアクター後半部の ANAMMOX 活性を上昇・維持させることにより、anammox リアクター全体として、最大窒素除去速度 31.2 kg-N/m³/day を達成した。

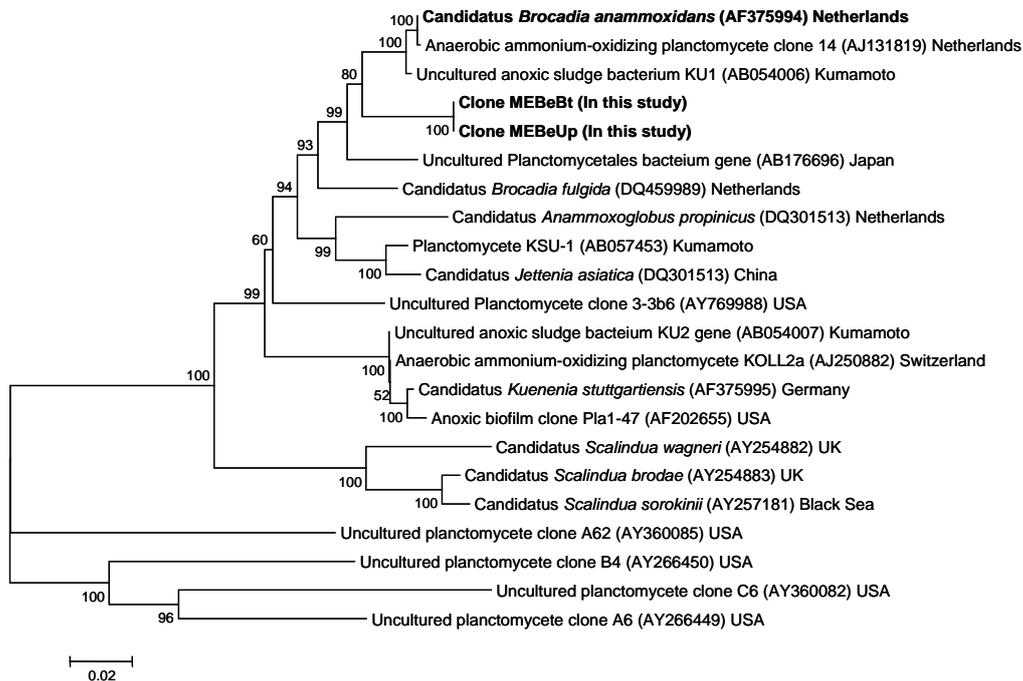
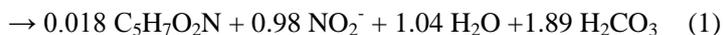
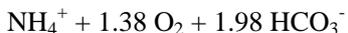


図 5 16S rDNA 遺伝子に基づく系統解析による anammox 細菌の系統樹(1438 bp)

2. 4. 2 部分硝化プロセスの最適条件を検討

新規の窒素除去プロセスである anammox プロセスの導入においては、前段において亜硝酸性窒素の生産を行う部分硝化プロセスの確立が必要である。

部分硝化反応（アンモニア酸化反応）はアンモニア酸化細菌（AOB）によって担われ (1) に示す化学量論式で示されるが、生成した亜硝酸は直ちに亜硝酸酸化細菌（NOB）によって硝酸にまで酸化される (2)。



本研究では、ヒドロキシルアミン (NH₂OH) を系内に添加することにより、部分硝化反応の迅速な安定化及び性能向上を図ることを目的とし、anammox プロセスに応用可能な部分硝化プロセスの構築を目指すものである。また、DO 濃度など部分硝化プロセスの最適条件を検討した。

2. 4. 2. 1 部分消化リアクターの処理効率

本研究では、植種汚泥として創成川下水処理場の曝気槽内の活性汚泥を使用した。汚泥を約 20 日間馴養させた後、ポリエステル製の不織布を生物膜担体として充填した（充填率：1%）内

径 45 mm、全長 500 mm、容積 800 mL のガラス製固定床型リアクター内に汚泥を植種した。人工無機培地及び空気をリアクター下部より連続供給することにより連続運転を行った。部分硝化リアクター内に供給した人工無機培地の構成及び培養条件を表 2 に示す。人工無機培地内には亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活性を抑制すると報告されている¹¹⁾ ヒドロキシルアミン (NH₂OH) を、250 μM となるように添加した。また、重炭酸添加量は (1) に示したアンモニア酸化細菌 (AOB) の化学量論式にならない、供給するアンモニア性窒素濃度に応じて変化させた。流入及び流出水中の各窒素態濃度は、イオンクロマトグラフィーにより測定した。さらに、リアクター内よりバイオマスを採取しリアクター内の菌体重量 (VSS) を測定した。

表 2 人工無機培地の構成及び培養条件

| Synthetic Medium | | [mg/L] | Running Condition | |
|---|----------|----------|-------------------|------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | | 30-280 | Temperature | 38°C |
| KHCO ₃ | | 430-3140 | Influent pH | 7.8±0.1 |
| KH ₂ PO ₄ | | 27 | HRT | 4 h |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | | 300 | Air flow rate | 100 - 200 mL/min |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | | 180 | Volume | 800 mL |
| Trace Element Solution (TES I ,TES II) | | | | |
| NH ₂ OH | (250 μM) | 0.017 | | |

(1) 処理性の経日変化

窒素負荷量、亜硝酸生成速度、硝酸生成速度、及び曝気量の経日変化を図 6 に示す。部分硝化リアクターの運転開始後、曝気量を 100 ml/min 程度、HRT を 4 h に固定した状態で窒素負荷量のみを増加させた結果、リアクターの運転開始後 80 日間で 0.61 kg-N m⁻³ day⁻¹ の亜硝酸生成速度に到達した。また、硝酸生成速度は 0.03 kg-N m⁻³ day⁻¹ 以下で安定的に推移し、良好な部分硝化反応が確認された。次に、窒素負荷量を急激に低下 (1.1→0.2 kg-N m⁻³ day⁻¹) させたところ、亜硝酸生成速度の低下とともに硝酸生成速度が急激に上昇し、完全硝化の進行が確認された。ここで、完全硝化確認前の状態を Phase 1、完全硝化確認後の状態を Phase 2 と定義することにする。

さらに、Phase 2 において完全硝化から部分硝化への回復が確認された後、系内へのヒドロキシルアミン (NH₂OH) の添加を取り止めた状態でリアクターの運転を行った結果、Phase 2 における部分硝化回復時と同様の状態を維持することが可能であった。このヒドロキシルアミン (NH₂OH) の添加を取り止めた後の状態を Phase 3 として定義する。また、ヒドロキシルアミン (NH₂OH) の添加を取り止めた後、曝気量を 200 ml/min 程度に増加させた状態を Phase 4 として定義する。

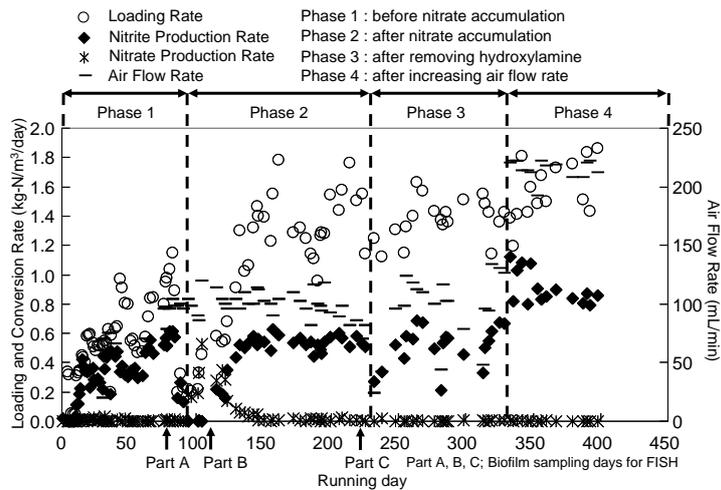


図 6 窒素負荷量、亜硝酸生成速度、及び硝酸生成速度の経日変化

(2) 完全硝化確認前 (Phase 1) における比アンモニア酸化活性

Phase 1 における亜硝酸生成速度が最大に達した後、亜硝酸生成速度を単位菌体重量 (g-VSS) あたりの値に変換した比アンモニア酸化活性の値を算出した結果 $0.27 \text{ g-N g-VSS}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。ここで、既往の報告における最大比アンモニア酸化活性の値を表 3 に示す。本研究における比アンモニア酸化活性の値は $0.27 \text{ g-N g-VSS}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であったが、この値は生物膜系による培養を行った報告より 2 倍以上高い値であった。これは、ヒドロキシルアミン (NH_2OH) により NOB の活性を抑制し、AOB のみを選択的かつ効率的に活性化することができたためであると考えられる。

表 3 既往の報告における最大比アンモニア酸化活性

| Specific ammonium oxidizing activity (g-N g-VSS ⁻¹ day ⁻¹) | System | Reference |
|--|----------------|---|
| 0.17-0.29 | Suspended | Tokutomi, 2004 ¹²⁾ Yang et al., 2003 ¹³⁾ |
| 0.08-0.10 | Biofilm | Garrido et al., 1997 ¹⁴⁾ Yun and Kim, 2003 ¹⁵⁾ |
| 0.12 | Biofilm | Chung et al., 2007 ¹⁶⁾ |
| 0.27 | Biofilm | In this study |

(3) 完全硝化確認後 (Phase 2) における処理性

Phase 2 における各窒素負荷量に応じたアンモニア消費速度、亜硝酸生成速度、硝酸生成速度、及びフリーアンモニア (NH_3) 濃度を図 7 に示す。低負荷領域 ($< 0.5 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) において

は、完全硝化が確認されたが、窒素負荷量を増加させることにより、硝酸生成速度の低下とともに亜硝酸生成速度が次第に上昇していった。窒素負荷量が $1.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 程度以上となった後は、亜硝酸生成速度及び硝酸生成速度は Phase 1 と同程度に推移し、部分硝化の回復が確認された。また、流出水中のフリーアンモニア (NH_3) 濃度の増加に伴い、部分硝化反応が回復する傾向が確認された。Anthonisen らは、フリーアンモニア (NH_3) 濃度が 0.1 mg/L 以上となった時に NOB の活性が抑制されたと報告¹⁷⁾しており、本実験においては、フリーアンモニア (NH_3) 濃度が 0.4 mg-N/L 程度となった時に硝酸生成速度の低下が確認されたことより、フリーアンモニア (NH_3) 濃度が NOB の活性抑制に寄与している可能性は高いと考えられる。

以上より、窒素負荷量を高負荷側に設定することにより、部分硝化反応を安定化させることができる可能性が示唆された。

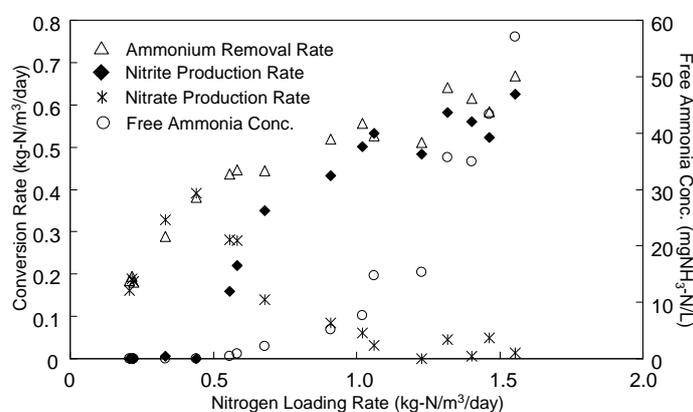


図 7 各窒素負荷量に応じたアンモニア消費速度、亜硝酸生成速度、硝酸生成速度、及びフリーアンモニア (NH_3) 濃度

(4) ヒドロキシルアミン (NH_2OH) 添加停止後 (Phase 3) における処理性

窒素負荷量を $1.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 以上の高負荷に保った状態でヒドロキシルアミン (NH_2OH) の添加を取り止めた後 (Phase 3) においても、亜硝酸生成速度は Phase 2 と同程度 ($0.6 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 付近) に推移した。このことから、ヒドロキシルアミン (NH_2OH) の系内への添加は、リアクターのスタートアップ時のみで十分であることが示唆された。また、ヒドロキシルアミン (NH_2OH) の系内への添加により部分硝化反応が安定した後は、ヒドロキシルアミン無添加の状態においても、窒素負荷量を $1.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 以上の高負荷に設定することにより、部分硝化反応を安定的に維持できる可能性が示唆された。

(5) 曝気量増加後 (Phase 4) における処理性

ヒドロキシルアミン (NH_2OH) の添加停止後において曝気量を 200 ml/min 程度に増加させた (Phase 4) 結果、最大亜硝酸生成速度 $1.1 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ を達成したが、その後速度の低下が確認され、亜硝酸生成速度は $0.9 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 程度で推移した。この速度の低下は曝気量の増加

による生物膜の剥離及び流出が原因であると考えられる。

曝気量と亜硝酸性速度との相関を図 8 に示す。図 8 より曝気量と亜硝酸生成速度との間には高い正の相関 ($R^2 = 0.84$) が認められ、このことから本研究における部分硝化反応の律速因子は電子受容体である溶存酸素量である可能性が示唆された。

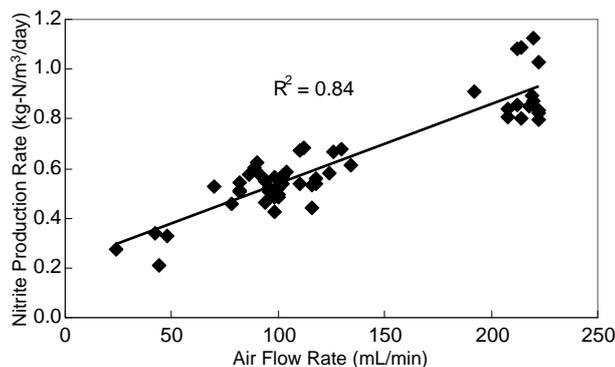


図 8 曝気量と亜硝酸生成速度との相関関係

(6) FISH 法による完全硝化確認前後における菌相解析

部分硝化確認時の Phase 1、完全硝化確認時の Phase 2、及び部分硝化回復時の Phase 3 において、リアクター内よりバイオマスを採取し FISH 法を行い、各硝化細菌の存在割合を算出した。FISH 法に用いた蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、*Nitrosomonas* spp. (AOB) に特異的な NEU (5'-CCCCTCTGCTGCACTCTA-3')、Phylum *Nitrospira* (NOB) に特異的な Ntspa712 (5'-CGCCTTCGCCACCGGCCTTCC-3')、及び *Nitrobacter* spp. (NOB) に特異的な NIT3 (5'-CCTGTGCTCCATCCG-3') の 3 種である。完全硝化確認前の Phase 1 (Part A) においては、*Nitrosomonas* spp. に特異的な NEU の蛍光が確認されたが、Phylum *Nitrospira* 及び *Nitrobacter* spp. に特異的な Ntspa712 及び NIT3 の蛍光は確認されなかった。次に Phase 2 で完全硝化確認後の状態 (Part B) においては、NEU 及び Ntspa712 の蛍光がそれぞれ確認された。さらに、Phase 2 で部分硝化回復後の状態 (Part C) においては、NEU の蛍光が顕著に見られたが、Ntspa712 の蛍光もごく僅かに確認された。しかし、Part B 及び Part C においても Part A 同様 NIT3 の蛍光は確認されなかった。また、各 Part における各硝化細菌 (*Nitrosomonas* spp., Phylum *Nitrospira*, *Nitrobacter* spp.) の存在割合を算出した結果、*Nitrosomonas* spp. は Part A では 34%、Part B では 9%、Part C では 47% 存在しており、完全硝化確認時における存在割合の低下、及び部分硝化回復時における存在割合の増加が確認された。また、Phylum *Nitrospira* は Part A では 0%、Part B では 4%、Part C では 2% 存在しており、完全硝化確認時において存在が確認され、部分硝化回復時においてもごく僅かの存在が確認された。

以上の結果をまとめると、

- ・ ヒドロキシルアミン (NH_2OH) を $250 \mu\text{M}$ となるように系内に添加することで、迅速な部分硝化リアクターのスタートアップに成功し、運転開始後 80 日間で $0.61 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ (0.27 g-N

g-VSS⁻¹ day⁻¹) の亜硝酸生成速度に到達し、また、運転開始後 333 日目には最大亜硝酸生成速度 1.1 kg-N m⁻³ day⁻¹ を達成した。

- ・ 窒素負荷量を 1.0 kg-N m⁻³ day⁻¹ 以上の高負荷に設定することによって、完全型硝化反応から部分硝化反応への回復及び安定化が可能なが示唆された。
- ・ 高負荷運転に伴うフリーアンモニア (NH₃) 濃度の上昇が亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活性を抑制している可能性が示唆された。

さらに、部分硝化プロセスの安定化、高効率化を図るために、1)多量のバイオマスを保持できることから高速処理が可能となる、2)阻害物質に対する耐性が高まる、3)汚泥の固液分離が容易になる、等の利点を有するグラニュー汚泥を用いた廃水処理プロセスに着目した。現在、グラニュー汚泥を用いたプロセスとして UASB 法は広く普及しており、その他にも硝化脱窒プロセス、リン除去プロセスとして応用に成功した事例が報告されている。しかしながら、部分硝化-anammox プロセスの前段(部分硝化プロセス)に、好気性グラニュー汚泥を用いた報告は無い。

本研究では、好気性グラニュー汚泥を用いた部分硝化リアクターの立ち上げを目指し、活性汚泥を種汚泥としてグラニュー汚泥の育成を行った。また、曝気量を制限することによって部分硝化反応の安定化を目指した。

リアクター概要および運転条件として、上向流エアリフト型リアクター(外筒: 高さ 80cm、直径 7cm、内筒 高さ 33cm、直径 4cm、アクリル製)を用い逐次回分的に運転した。リアクター容積は 2.5L で、種汚泥として札幌市創成川水処理センターで運転されているパイロットスケール MBR の汚泥混合液を投入した。リアクター運転時のタイムシーケンスは以下の通りとした; 人工基質供給 5 分、好気処理 220 分、沈殿 10 分、排出 5 分、計 240 分。好気処理条件ではリアクター底部よりエアポンプによる曝気(0.5~1 L min⁻¹)を行った。人工基質は以下の組成で調整した: (NH₄)₂SO₄ 2.36 g L⁻¹、CH₃COONa 0.64 g L⁻¹、KH₂PO₄ 28 mg L⁻¹、KHCO₃ 4.7 g L⁻¹。運転 0 日目から 23 日目までは容積負荷 0.6 kg-N m⁻³ day⁻¹ で運転し、24 日目以降は 1.2 kg-N m⁻³ day⁻¹ で運転した。リアクターの設定 HRT は 8 時間とし、余剰汚泥引き抜きによる SRT の制御は行わなかった。本リアクターは温度制御無しで運転し、運転期間における室温は 8~20°C だった。

運転期間において、グラニュー汚泥がリアクター内で育成される様子が観察された。種汚泥では大きさ 200 μm 程度の活性汚泥フロックであったが、運転 30 日目には約 3 mm 程度のグラニューまで成長した。この際の SVI₃₀ は 50 mL g⁻¹ 以下であり、良好な沈降性を示した。本リアクターは部分硝化能として亜硝酸生成速度 1.25 kgN m⁻³ day⁻¹ (亜硝酸への転換率約 50%) を達成したのみならず、90%以上の安定した TOC 除去能を持ち、anammox プロセスの前段に設けるリアクターとして期待される性能を示した。部分硝化-anammox プロセスの前段(部分硝化プロセス)に、好気性グラニュー汚泥を用いた報告は無く、極めて新規な部分硝化嫌気性グラニューリアクターを構築できた。

2. 4. 3 人工廃水を処理する部分硝化-Anammox 並列リアクターの開発

2. 4. 1で開発した anammox リアクターと2. 4. 2で開発した部分硝化リアクターを結合した、部分硝化-Anammox 並列型リアクターを作成し、人工廃水を用いて長期連続運転を行った。この実験により、流入基質としてアンモニア性窒素のみを部分硝化リアクターに供給し、窒素ガス (N_2)まで直接変換することを試みた。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 $15.0 \text{ Kg-TN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ を達成した。本研究の最終目標であった最大窒素除去速度 $12.0 \text{ Kg-TN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ を達成できた。

2. 4. 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

本研究で構築した部分硝化-Anammox プロセスにおける N_2O の発生割合を調査した結果、プロセス全体に流入する全窒素量に対して、部分硝化リアクター気相中では 4.0 %、液相中では 0.003 %であり、また、Anammox リアクター気相中では 0.08 %、液相中では 0.02 %であった。Anammox グラニュールからの N_2O の発生量は pH に依存することが示唆された。部分硝化-Anammox プロセスからの N_2O 生成を低減するためには、部分硝化グラニュールおよび Anammox グラニュールからの N_2O 生成メカニズムを解明する必要がある。そこで、微小電極を用いて部分硝化および Anammox グラニュール内の NO および N_2O を測定し、発生メカニズムを解析した。容積 2L のアクリル容器に部分硝化グラニュールを充填し、半回分型部分硝化リアクターとした。タイムシーケンスは、人工基質供給 2 分、好気処理 233 分、沈殿 3 分、排出 2 分(計 240 分)とした。アンモニア (NH_4^+) 負荷を 1.0g-N/L/day とし、HRT は 8 h とした。80 日間リアクターを運転したところ、運転開始時から部分硝化反応が見られた。亜硝酸 (NO_2^-) 変換率は 40% から 60% であった。ヘッドスペース中の N_2O を測定した結果、 N_2O 濃度は 30 ppm から 70 ppm、 N_2O 発生速度は 30 から 70 $\mu\text{mol/L-グラニュール/day}$ 、 NO_2^- 生成速度に対する N_2O 発生速度の比は 0.84% であることが明らかとなった。

半回分式運転の 1 サイクルにおける、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、DO、pH、 N_2O を詳細に測定した。 NH_4^+ は運転時間に比例して減少し、化学量論的に正しい量の NO_2^- が生成した。エアレーションをしない人工基質供給期間には、 N_2O は約 1 ppm であった。好気処理開始時にエアレーションを開始したところ、急激に N_2O が増大し、5 分後には最大(約 100 ppm)となった。その後、基質供給から約 60 分後までに N_2O は約 50 ppm まで減少した。その後も N_2O は減少したが、減少速度は小さかった。沈殿のためにエアレーションを止めたところ、 N_2O は 4 分程度で約 1 ppm まで低下した。微小電極を用いて PN および Anammox グラニュール内の NO および N_2O を測定した。PN および Anammox グラニュールともに、表面から深さ 100 μm の地点に NO のピークが観察された。ピークの濃度は、PN グラニュールでは 0.8 μM であったのに対し、Anammox グラニュールでは 2.0 μM であった。 N_2O は、部分硝化および Anammox グラニュールともに、表面からグラニュール中心に向かって(グラニュール中心を原点とする)放物線を描いて増大した。中心での N_2O は、PN グラニュールでは 15 μM 、Anammox グラニュールでは 20 μM であった。

2. 4. 5 Anammox 細菌のメタゲノム解析

Anammox 細菌は増殖速度が極めて遅く(倍化時間約 1-2 週間)、有機物や酸素曝露により活性の阻害を受けるため集積培養は非常に困難である。このような理由からこれまでに、経験に基づく試行錯誤的な方法で集積培養に成功した事例は少なく、anammox 細菌は、未だ単離培養されておらず、生理・生態に関する知見も少なく最適培養条件も未知な点が多い。このような難培養性の細菌を活用するためには、ゲノム情報から基礎的な生理・菌学的特長の違い、進化系統の違いなどの検討を行う必要がある。また、排水処理への適用を考えた場合においても、リアクターの立ち上げ、負荷変動への対応、酸素阻害、など最適運転条件を、ゲノム情報に基づき検討する必要がある。本研究では、*Ca. 'B. sinica'*の代謝特性を網羅的に理解する事をめざし、メタゲノム解析によって *Ca. 'B. sinica'*の全ゲノム配列の決定を試みた。

*Ca. 'B. sinica'*の集積培養系を構築するため、嫌気槽から活性汚泥を採取し、ガラス製上向床型カラムリアクターへ殖種した。リアクターへ基質としてアンモニア、亜硝酸($50\sim 200\text{mgN L}^{-1}$)を含む無機栄養塩培地を連続通水し、嫌気条件を維持しながら 37°C において 100 日以上連続培養を行なった。リアクター内における anammox 活性を水質モニタリングによって確認した後、集積培養系における *Ca. 'B. sinica'*の優占度を調査した。Anammox 菌特異的な蛍光遺伝子プローブを用いた FISH 法および 16S rRNA 遺伝子配列のダイレクトシーケンスを行なった結果、我々が獲得した集積培養系において、1) anammox 菌が全バイオマス中の 9 割以上を占めていること、2) *Ca. 'B. sinica'*が単一種として存在することが明らかとなった。これらの結果から、メタゲノム解析に適した試料を得る事に成功したと判断し、ゲノム DNA の抽出および高速シーケンス解析を行なった。高速シーケンス解析では、GS FLX Titanium (Roche)を用い、1/2 プレートのシーケンス解析をフラグメント解析および 3kb のペアエンド解析について実施した。得られた配列を GS *de novo assembler*によってアセンブルし、scaffold 配列を得た。さらに、scaffold 間に存在する未知リンクを解析するため、フォスミドライブラリ(インサート長: 30-40kb)を作成し、scaffold 末端配列に特異的な PCR プライマーを用いて、フォスミドクローン(1000 クローン)をスクリーニングした。最終的に得られた scaffold 内に存在するギャップ領域について、プライマーウォーキング法によって塩基配列を決定し、contig 配列とした。Contig 配列に対する遺伝子予測として、CDS 予測は Glimmer 2 および CRITICA、rRNA 予測は Blastn、tRNA 予測は tRNA-Scan-SE を用いて行なった。

メタゲノム解析の結果、4.0Mbp (GC 含量 41%)の 1 contig からなるゲノム配列の再構築に成功した。保存遺伝子の有無に基づき、本 contig のゲノムカバー率を予測した結果、ゲノム全体の少なくとも 98%をカバーする配列であることが明らかとなった。Anammox 菌についてこれまでに 2 件のメタゲノム解析結果が報告されているが、それらは 5 または 7662 contigs からなる断片的なゲノム情報を提示しているにすぎず、本研究において極めて完成度の高いゲノム配列を決定することができた。こうした完成度の高いゲノム配列は、代謝特性を網羅的に理解するために必須であり、本研究においてこの目的を達成することができた。

遺伝子予測解析の結果、*Ca. 'B. sinica'*のゲノム上からは 3900 個の遺伝子が見いだされた。窒素代謝関連遺伝子について、anammox 細菌の一種である *Ca. 'Kuenenia stuttgartiensis'*と比較

したところ、anammox 反応における亜硝酸還元を担うと考えられていた *nirS* 遺伝子が *Ca. 'B. sinica'* のゲノム上から見いだされなかった。従属栄養性脱窒菌または anammox 菌の *nirS* 遺伝子に特異的な PCR プライマーを用いて *nirS* 遺伝子の有無をさらに調べたが、こちらの解析においても *nirS* 遺伝子は *Ca. 'B. sinica'* のゲノム上からは見いだされなかった。この発見は *Ca. 'B. sinica'* が *Ca. 'K. stuttgartiensis'* とは異なる経路で anammox 反応を行なっていることを示唆している。*Ca. 'B. sinica'* が持つ高い増殖速度($m_{max}=0.0041 \text{ h}^{-1}$)はこうした代謝経路の違いによって生み出されている可能性があり、代謝経路の詳細な解明および関連遺伝子群の同定が今後望まれる。

2. 4. 6 実廃水を用いた実証試験 (Anammox プロセスのみ)

消化汚泥脱離液を部分硝化リアクター処理にて処理し、その処理水を anammox リアクターへ連続的に供給しながら約 120 日間の運転を行なった。各態窒素濃度、窒素負荷および除去率の経日変化をそれぞれ図 9 および図 10 に示す。運転 40 日目までの Phase1 では、流入水を約 3 倍に希釈し、anammox リアクターへ導入した。Phase 1 において、流入水中のアンモニアおよび亜硝酸が同時に除去され、容積当り窒素負荷 $8\sim 10 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ に対して、窒素除去率 $8\sim 9$ 割を達成した。この結果から、消化汚泥脱離液を部分硝化リアクターで処理した廃水について、anammox プロセスにおいて連続処理が可能であることが明らかとなった。なお、TOC 濃度は流入水、処理水で明瞭な差は無く、anammox リアクターにおける顕著な有機物除去は確認されなかった。

システム全体のコンパクト化を目指すため、流入原水の希釈率を 4 から 3 に低下させ、phase 2 の運転を行なった。Phase 2 開始直後において、窒素除去率が 6 割まで低下した。この際、処理水 pH が 8.7 付近まで上昇しており、高 pH が原因となり、anammox 活性の阻害が生じた可能性が考えられた。そこで、50 日目より重炭酸カリウムの添加(終濃度 500 mg/L)を開始し、pH を 7.5~8 付近で調整した。この操作によって、窒素除去率が $8\sim 9$ 割まで一時的に回復したものの、効果は一時的であり、70 日目以降から再び窒素除去率が低下傾向を示した。

Phase 3 では、窒素除去率を phase 1 相当まで回復させる目的で、設定 HRT を 1.7h から 3.5h に延長し、運転を行なった。その結果、窒素除去率は 9 割まで回復し、良好な処理性能を示した。Phase 2 における窒素除去率の低下の原因として、流入水に含まれる高濃度の NO_2^- (300 mg/L) による anammox 活性の阻害が考えられ¹⁸⁾、流入水の希釈率を高めるといった対策も考えられたが、phase 3 では HRT を延長するという単純な操作により窒素除去性能を回復させることができた。

Phase 4 では、phase 2 と同じく、HRT を 1.5h まで短縮し、容積負荷は $6 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ とした。Phase 4 以降直後から窒素除去率が顕著に低下し、最終的に anammox 活性が消失した。Phase 4 における活性低下の原因は明らかでないが、設定窒素負荷を低下させた後、再度上昇させる場合には anammox 活性の消失に細心の注意を払う必要があると言える。

消化脱離液を対象とした、anammox プロセスによる実廃水の窒素除去性能について、連続 120 日間の運転を行なったところ、適切な条件下では容積負荷 $8 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ の条件下でも安定した窒素除去を達成することができた。一方、1) 高濃度原水の供給、2) 高 pH は anammox リアクターにおける

窒素除去性能の低下を招く事が明らかとなった。これまでに報告がなされている部分硝化リアクターの最大窒素負荷は $3 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ であり¹⁹⁾、これは本研究で達成した anammox リアクターの窒素除去速度の約 1/2 にすぎない。従って、Anammox リアクターの容積は部分硝化リアクターの約半分以下で十分であり、コンパクトな施設で窒素除去を達成できると考えられる。

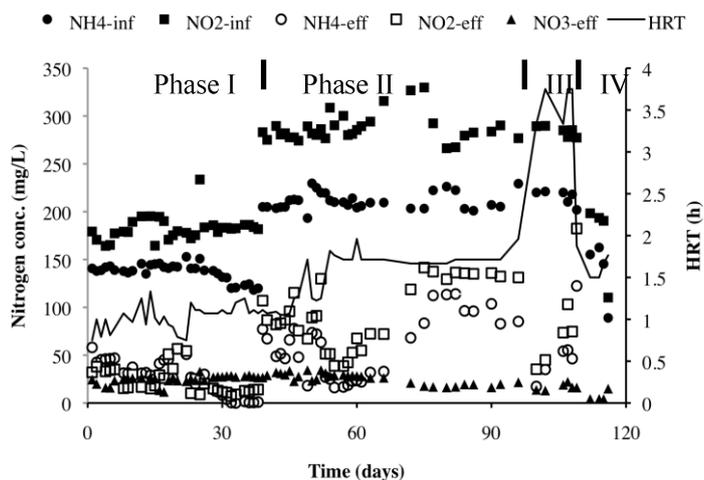


図 9 Anammox リアクター流入水および処理水における各態窒素濃

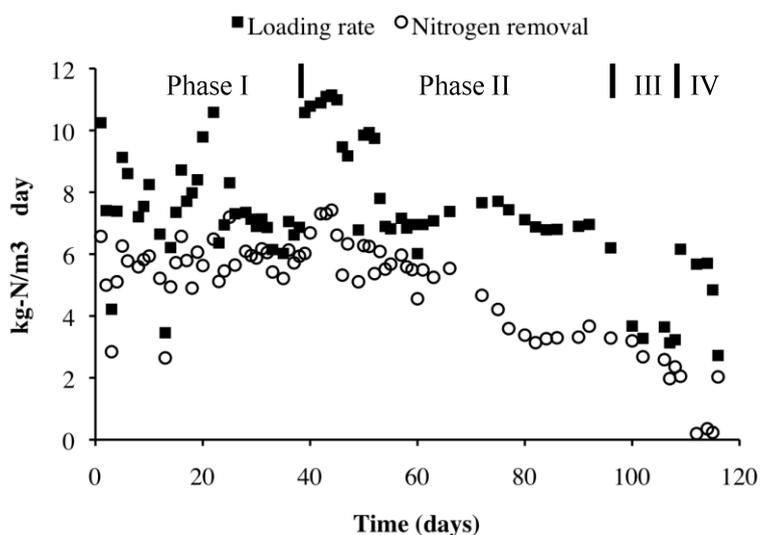


図 10 Anammox リアクターの容積窒素負荷および窒素除去率の経日変化

参考文献

- 1) **Tsushima, I., T. Kindaichi, and S. Okabe.** Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research*, Vol. 41, pp. 785-794, 2007.
- 2) **Tsushima, I., Y. Ogasawara, T. Kindaichi, and S. Okabe.** Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Research*, Vol. 41, pp. 1623-1634, 2007.
- 3) **Kindaichi, T., I. Tsushima, Y. Ogasawara, M. Shimokawa, N. Ozaki, H. Satoh, and S. Okabe.** *In situ* Activity and Spatial Organization of Anammox Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73 (15), Pp. 4931-4939.
- 4) **Jetten, M. S. M., M. Strous, K. T. van de Pas-Schoonen, J. Schalk, U. G. J. M. van Dongen, A. A. van de Graaf, S. Logemann, G. Muyzer, M. C. M. van Loosdrecht, and J. G. Kuenen.** The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology reviews*, Vol. 22, pp. 421-437, 1999.
- 5) **Amann, R. I.,** In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, p. 1-15. In A. D. L. Akkerman, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.). *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- 6) **Okabe S., Satoh H., and Watanabe Y.** (1999) *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.65 (7), Pp. 3182-3191.
- 7) **Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K. H. Schleifer, and M. Wagner.** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 22, pp. 434-444, 1999.
- 8) **Schmid, M., S. Schmitz-Esser, M. S. M. Jetten, and M. Wagner.** 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environmental Microbiology*, Vol. 3, pp. 450-459, 2001.
- 9) **Neef, A., R. Amann, H. Schlesner, and K. H. Schleifer.** Monitoring a widespread bacterial group in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*, Vol. 144, pp. 3257-3266, 1998.
- 10) **Weisberg, W., S. Barns, D. Pelletier, and D. Lane.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *The Journal of Bacteriology*, Vol. 173, pp. 697-703, 1991.
- 11) **Kindaichi, T., S. Okabe, H. Satoh, and Y. Watanabe.** Effects of hydroxylamine on microbial community structure and function of autotrophic nitrifying biofilms determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Water Science and Technology*, Vol. 49, pp. 61-68, 2004.
- 12) **Tokutomi, T.** Operation of a nitrite-type airlift reactor at low DO concentration. *Water Science and Technology*, Vol. 49, pp. 81-88, 2004.
- 13) **Yang, W., J. Vllertsen and T. Hvitved-Jacobsen.** Nitrite accumulation in the treatment of wastewaters with high ammonia concentration. *Water Science and Technology*, Vol. 48, pp. 135-141, 2003.
- 14) **Garride, J. M., W. A. J. van Benthum, M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen.** Influence of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 53, pp. 168-178, 1997.
- 15) **Yun, H. J. and D. J. Kim.** Nitrite accumulation characteristics of high strength ammonia wastewater in an autotrophic nitrifying biofilm reactor. *Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology*. Vol. 78, pp. 373-383, 2003.
- 16) **Chuang, H. P., A. Ohashi, H. Imachi, M. Tandukar and H. Harada.** Effective partial nitrification to nitrite by down-flow hanging sponge reactor under limited oxygen condition. *Water Research*, Vol. 41, pp. 295-302, 2007.
- 17) **Anthonisen, J. E., R. C. Loehr, T. B. S. Prakasam, and E. G. Srinath.** Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF*, Vol. 48, pp. 835-852, 1976.
- 18) **Oshiki, M., M. Shimokawa, N. Fujii, H. Satoh and S. Okabe.** 2011. Physiological Characteristics of the Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacterium 'Candidatus Brocadia Sinica'. *Microbiology*. Vol.157, pp.1706-1713.
- 19) **Chen, J., P. Zheng, Y. Yu, Q. Mahmood and C. Tang.** 2010. Enrichment of High Activity Nitrifiers to Enhance Partial Nitrification Process. *Bioresource Technology*. Vol.101(19), pp.7293-7298.

年度毎の特許、論文、外部発表（件数）

北海道大学工学研究院

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

| 区分 年度 | 特許出願 | | | 論文 | | その他外部発表 （プレス発表等） |
|----------|------|----|--------|------|-----|---------------------|
| | 国内 | 外国 | PCT※出願 | 査読付き | その他 | |
| 平成19年 | 0件 | 0件 | 0件 | 1件 | 1件 | 0件 |
| 平成20年 | 0件 | 0件 | 0件 | 0件 | 1件 | 0件 |
| 平成21年 | 0件 | 0件 | 0件 | 0件 | 0件 | 0件 |
| 平成22年 | 0件 | 0件 | 0件 | 1件 | 0件 | 0件 |
| 平成23年 | 0件 | 0件 | 0件 | 4件 | 5件 | 0件 |

（※Patent Cooperation Treaty：特許協力条約）

2.5 デザイン化微生物群を用いた高効率固定床メタン発酵の研究開発

(財団法人 電力中央研究所、共同実施先：東京大学)

はじめに

本研究開発では、廃棄物処理の一つであるメタン発酵において、メタン発酵プロセスの3倍の効率化を図ることにより、従来のメタン発酵槽に比べて約50%のコンパクト化を実現し、固形分を多く含む有機性廃棄物への適用拡大を可能とすることを目指した。このような目標達成のために、メタン発酵のプロセスにおいて高い負荷量でもメタン発酵に有用な微生物群及び処理能力を安定的に維持できる技術を開発し、高負荷運転(短い滞留時間)でメタン発酵処理を可能とする基盤技術の開発を進めた。必要とされる基盤技術の開発として、高負荷時でも有用な微生物群(デザイン化微生物群)を維持する担体の選定、及び発酵槽内への通電による微生物群・メタン発酵の制御・安定化技術に関して検討し、さらにそれらの成果を組み合わせる微生物群担体の機能を最大限発揮させるアプローチをとった。すなわち、本研究開発では、研究対象の基本を固定床メタン発酵とし、次の5項目について実施した。まず、(1)有機系固形廃棄物の処理に適したメタン発酵に有用な微生物群を取得した。(2)取得した有用微生物群を効率的に保持させる担体について、処理性能などの観点から選定した。(3)メタン発酵槽に設置した電極を電位制御することで、メタン発酵の処理能力を高負荷時に安定的に維持する技術を確立した。(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として、上述の成果を組合せ、固定化担体への電位制御による安定化を行い、メタン発酵の効率化及びメタン発酵槽のコンパクト化の可能性を評価した。最後に、(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の立証として、実廃棄物を用いて通電型固定床メタン発酵槽の性能を評価した。

各項目においてメタン発酵の技術開発は電力中央研究所が実施し、発酵槽内の微生物群集の解析は共同実施先である東京大学が実施した。

2.5.1 デザイン化の素材となる有用微生物群の取得と特性・機能評価

2.5.1.1 有用微生物群の取得と維持

本研究の処理対象は、生ごみなどの固形分を主体とする有機性廃棄物である。処理を行うための有用な微生物群の取得を実施するにあたり、取り扱いやすさや実験の再現性の観点から、使用する模擬廃棄物(模擬生ごみ)としてドッグフードを選択した。デザイン化微生物群の素材として、模擬廃棄物の分解に適した微生物群を取得するため、湖沼の底泥を種菌として2%ドッグフードスラリーを55℃で嫌氣的に維持した。その結果、模擬廃棄物分解による安定的なガス発生を確認し、模擬廃棄物の高温メタン発酵に適応した微生物群を取得することに成功した。取得した有用微生物群については、2.0L容量の発酵槽を使用し連続運転することによって微生物群を維持し、本研究の2.5.3以降のメタン発酵の種汚泥として用いた。ただし、本研究の2.5.2のうち

2.5.2.1 及び 2.5.2.2 については、種汚泥取得までに時間が掛かることが想定されたため、鹿島建設株式会社より提供されたメタン発酵槽の発酵液を種汚泥として用いた。

2.5.1.2 有用微生物群の特性

デザイン化の素材となる有用微生物群に関して、その特性を把握するために、末端制限断片長多型(T-RFLP)解析及びクローン解析により検討を行った。その結果、微生物群を集積したことにより、細菌についてはタンパク質分解菌やセルロース分解菌として報告されている菌に近縁な細菌が特異的に見られ、古細菌については、高温メタン発酵で頻繁に検出される水素資化性メタン菌である *Methanothermobacter* 属や *Methanobacterium* 属、また酢酸資化性メタン菌である *Methanosarcina* 属のメタン菌などが存在していることを明らかにした。

2.5.2 有用微生物群を用いた微生物群担体の効果

2.5.2.1 固定床メタン発酵における担体の種類による処理能力への影響評価

固定床メタン発酵において、模擬廃棄物のメタン発酵に有用な微生物群を効果的に保持するための担体を選定する目的で、担体の種類がメタン発酵に及ぼす影響、特に負荷量に対するメタン発酵の安定性を中心に検討した。担体としては、板状で親水性のガラス板(GS)及び疎水性のポリエチレン板(PES)と炭素板(グラッシーカーボン板)(CS)、繊維状のガラス繊維(空隙率 25%)(GF)、ポリエチレン繊維(空隙率 98%)(PEF)および炭素繊維(空隙率 98%)(CFT)の特性が異なる 6 種類を用いた。メタン発酵槽の運転では 2%ドッグフードスラリーを模擬廃棄物とし、担体なし(control)または各担体(2.3×7.0×0.3 cm、2 枚)を設置した容量 200ml の発酵槽を 55℃で最長 73 日間継続運転した。運転の期間中、負荷量に対する各発酵槽の安定性を評価するために、図 1 に示すように水理的学的滞留時間(HRT)を段階的に短くするとともに、HRT3.1 日ではドッグフードスラリー濃度を 2%から 4%に変更し、発酵槽への有機物負荷量(OLR)を段階的に増加した。

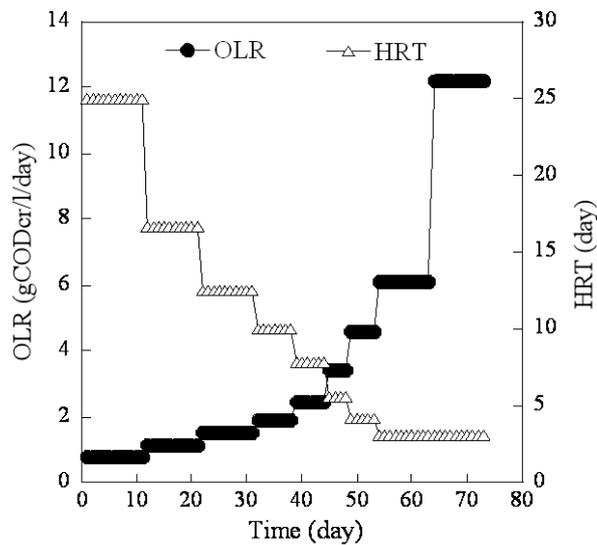


図1 有機物負荷量(OLR)と水理的学的滞留時間(HRT)の経時変化

各担体を用いてメタン発酵を実施した結果は、図 2 及び図 3 に示すとおりである。担体なし (control) 及びガラス板 (GS)、ポリエチレン板 (PES)、炭素板 (グラッシーカーボン板) (CS) を設置した発酵槽では、45 日目以降においてガス生成速度の低下、メタン含有率の低下、及び VFA 濃度の増大が見られた (図2)。また、COD 除去率及び SS 除去率 (それぞれ 29-35%、22-33%) から発酵不良と判断され (図3)、板状の担体の設置は、メタン発酵の有機物負荷に対する安定化に顕著な効果がないという結果を得た。このときの OLR は 4.6gCODcr/L/日であり、この負荷条件以下が、対照区である担体なし (control) を含めガラス板 (GS)、ポリエチレン板 (PES)、炭素板 (グラッシーカーボン板) (CS) を設置した発酵槽における安定したメタン生成が可能な範囲であった。一方、繊維状の担体を設置したメタン発酵槽のうち担体としてガラス繊維 (GF) を設置した発酵槽では、64 日目以降ガス生成速度の低下などが見られ、負荷上限は OLR 6.1gCODcr/L/日であった。ポリエチレン繊維 (PEF) 及び炭素繊維 (CFT) を設置した発酵槽では、さらに高い OLR (12.2gCODcr/L/日) の条件においても、VFA の蓄積する傾向は見られるものの、安定したガス生成を確認した (図2)。COD 除去率及び SS 除去率もそれぞれ 50% 以上、40% 以上を維持しており (図3)、高い有機物負荷に対してこれらの担体の設置がメタン発酵の安定化に寄与するという結果を得た。従って、本試験で使用した 6 種類の担体においては、空隙率の高い繊維状の担体の設置が、高負荷時のメタン発酵槽の安定化に有効であった。

以上の結果、メタン発酵槽への適切な担体の設置が、高い有機物負荷時におけるメタン発酵槽の安定化に寄与する可能性を見いだした。設置する担体としては、空隙率の高い繊維状の担体が適していると考えられた。

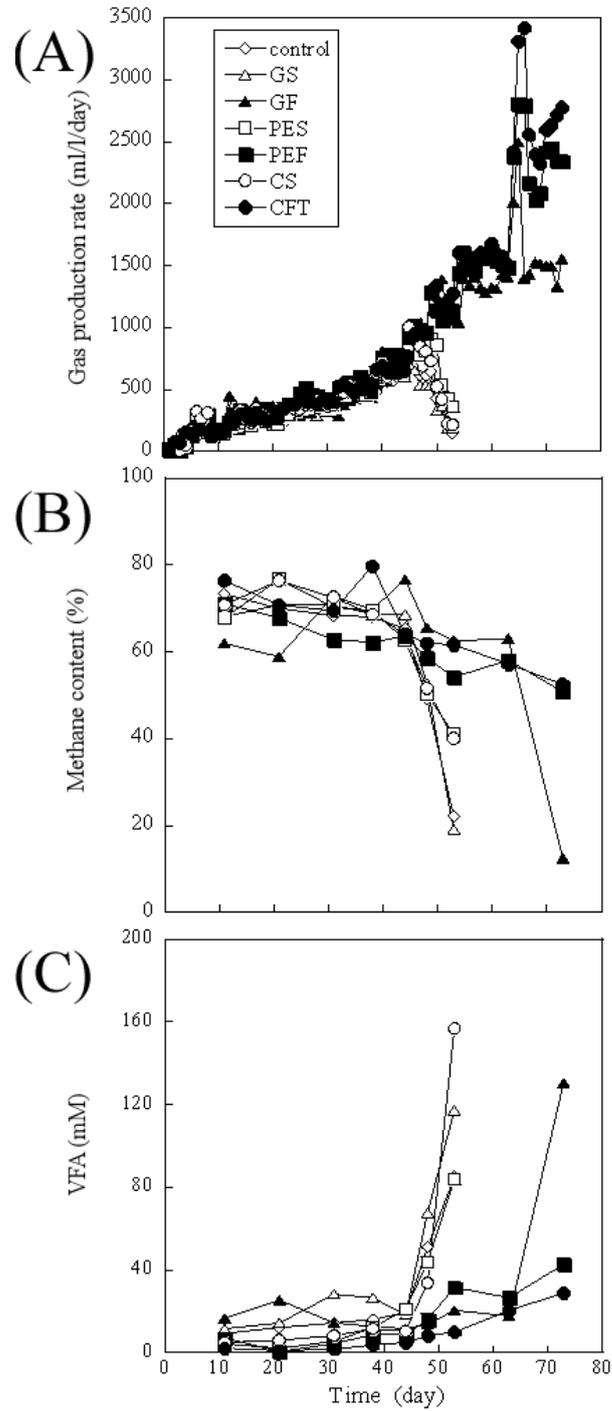


図2 (A)ガス生成速度、(B)メタン含有率、及び(C)低級脂肪酸濃度(VFA)の経時変化
担体なし(control)、ガラス板(GS)、ガラス繊維(GF)、ポリエチレン板(PES)、ポリエチレン繊維(PEF)、
炭素板(グラッシーカーボン板)(CS)、炭素繊維(CFT)

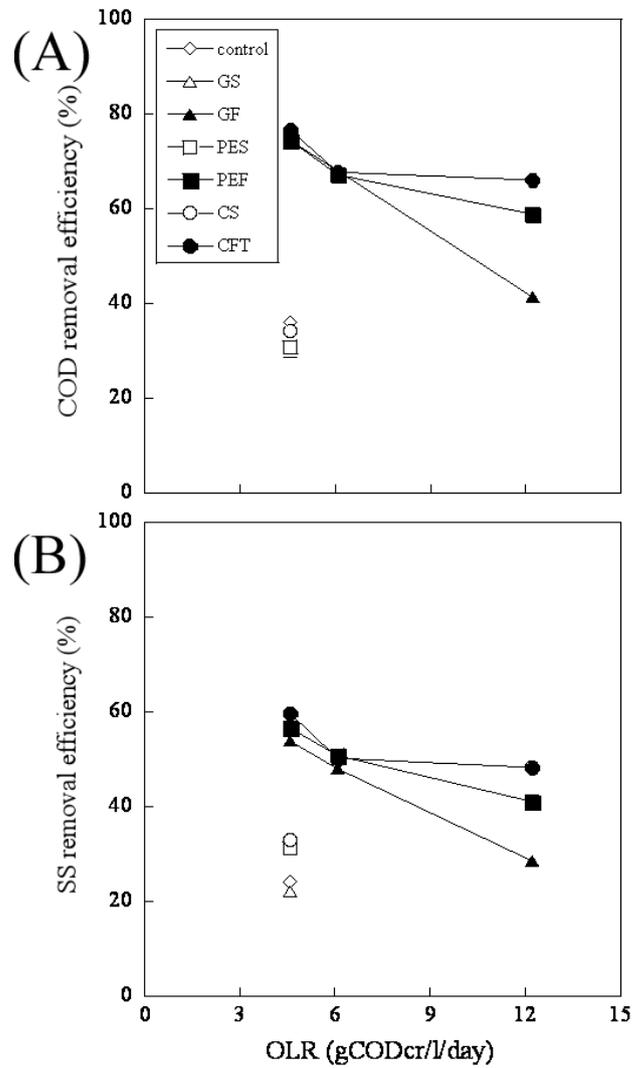


図3 有機物負荷量(OLR)と(A)化学的酸素要求量(COD)除去率及び(B)浮遊固形分(SS)除去率との関係

担体なし(control)、ガラス板(GS)、ガラス繊維(GF)、ポリエチレン板(PES)、ポリエチレン繊維(PEF)、炭素板(グラッシーカーボン板)(CS)、炭素繊維(CFT)

2.5.2.2 発酵槽内の微生物群集の解析

各発酵槽内の微生物量を評価するために、担体上と発酵液中のDNAを定量化した。運転 53 日目 (OLR 4.6gCOD_{cr}/L/日) または 73 日目 (OLR 12.2gCOD_{cr}/L/日) における各発酵槽内の担体上と発酵液中からDNAを抽出し、全菌のDNA量、メタン菌(メタン生成に関与)のDNA量を定量 PCR (リアルタイム PCR) によって定量化した。その結果、運転 53 日目の 5 種類の発酵槽において発酵液中の全菌およびメタン菌のDNA量は同程度であったのに対して、炭素繊維 (CFT) を用いた場合、担体なし (control) 及び板状の担体 (GS、PES、CS) と比較して担体上の全菌及びメタン菌のDNA量が最大 3 桁程度大きく、顕著な差を確認した (表1)。また、担体上において全菌に対するメタン菌の割合が 22.3~37.4% と発酵液中と比較して高い傾向があるという興味深い結果も得た。次に、繊維状の担体を比較した場合 (表2)、同程度の空隙率であるポリエチレン繊維及び炭素繊維 (PEF、CFT) では、発酵液中及び担体上の微生物量は同程度であった。負荷量が低い運転時 (OLR 4.6gCOD_{cr}/L/日) の炭素繊維 (CFT) と比較しても顕著な差は無かった。以上の結果から、いずれの担体を用いても発酵液中の全菌、メタン菌の菌体量に差はないが、担体上の菌体量はポリエチレン繊維及び炭素繊維 (PEF、CFT) を設置した場合に大きくなる傾向があり、発酵槽中の微生物を高密度化できることを明らかにした。また、全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合は担体上で大きくなる傾向があり、担体の設置は特にメタン菌の維持に効果的であると考えられた。

表1 各発酵槽内の担体上と発酵液中の全菌のDNA量、メタン菌のDNA量、及び全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合

(運転 53 日目、有機物負荷速度 4.6gCOD/L/日、水理学的滞留時間 4.2 日)

| 充填した担体 | 画分 | 全菌 (コピー数/発酵槽) | メタン菌 (コピー数/発酵槽) | メタン菌/全菌 (%) |
|---------|----|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
| control | 浮遊 | $(1.9 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | $(1.3 \pm 0.1) \times 10^{11}$ | 6.9 ± 0.2 |
| GS | 浮遊 | $(1.8 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{11}$ | 5.5 ± 0.2 |
| PES | 浮遊 | $(6.1 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | $(1.8 \pm 0.1) \times 10^{11}$ | 2.9 ± 0.1 |
| CS | 浮遊 | $(4.2 \pm 0.4) \times 10^{12}$ | $(2.1 \pm 0.9) \times 10^{11}$ | 5.1 ± 1.9 |
| CFT | 浮遊 | $(3.2 \pm 0.2) \times 10^{12}$ | $(2.2 \pm 0.6) \times 10^{11}$ | 6.8 ± 1.6 |
| GS | 付着 | $(3.3 \pm 0.1) \times 10^9$ | $(1.2 \pm 0.1) \times 10^9$ | 36.8 ± 0.9 |
| PES | 付着 | $(1.1 \pm 0.1) \times 10^{10}$ | $(2.4 \pm 0.3) \times 10^9$ | 22.3 ± 2.2 |
| CS | 付着 | $(6.7 \pm 0.1) \times 10^9$ | $(1.8 \pm 0.1) \times 10^9$ | 27.0 ± 0.5 |
| CFT | 付着 | $(1.8 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | 37.4 ± 2.7 |

表2 各発酵槽内の担体上と発酵液中の全菌のDNA量、メタン菌のDNA量、及び全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合

(運転 73 日目、有機物負荷速度 12.2gCOD/L/日、水理的滞留時間 3.1 日)

| 充填した担体 | 画分 | 全菌 (コピー数/発酵槽) | メタン菌 (コピー数/発酵槽) | メタン菌/全菌 (%) |
|--------|----|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
| GF | 浮遊 | $(2.4 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | $(1.7 \pm 0.4) \times 10^{11}$ | 7.2 ± 1.8 |
| PEF | 浮遊 | $(3.5 \pm 0.4) \times 10^{12}$ | $(3.2 \pm 1.3) \times 10^{11}$ | 9.3 ± 3.4 |
| CFT | 浮遊 | $(6.2 \pm 0.7) \times 10^{12}$ | $(6.7 \pm 1.6) \times 10^{11}$ | 11.0 ± 2.6 |
| GF | 付着 | $(5.0 \pm 0.6) \times 10^{11}$ | $(5.1 \pm 0.5) \times 10^{10}$ | 10.4 ± 1.3 |
| PEF | 付着 | $(1.7 \pm 0.2) \times 10^{12}$ | $(3.8 \pm 0.3) \times 10^{11}$ | 22.0 ± 2.8 |
| CFT | 付着 | $(4.3 \pm 0.8) \times 10^{12}$ | $(1.5 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | 35.6 ± 6.5 |

次に、各発酵槽の微生物群集の構造と微生物種を発酵槽の処理能力と合わせて評価するため、T-RFLP 解析及びクローン解析を行った。運転 53 日目 (OLR 4.6gCOD_{cr}/L/日) または運転 73 日目 (OLR 12.2gCOD_{cr}/L/日) における各発酵槽 (担体なしを含む) の発酵液画分、担体付着画分から抽出した DNA を用い、細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした T-RFLP 解析を行った (図4)。また、T-RFLP 解析で検出された制限断片 (T-RF) を同定するため、OLR 4.6gCOD_{cr}/L/日の炭素繊維 (CFT) 付着画分から抽出した DNA について、TA クローニング法により 16S rRNA 遺伝子のライブラリを作成し、得られた配列の系統学的解析を行った。運転 53 日目における、担体なし (control)、ガラス板 (GS)、ポリエチレン板 (PES)、炭素板 (CS) 及び炭素繊維 (CFT) の発酵液及び担体上の細菌群集の T-RFLP 解析では、多種類の T-RF が検出され、複雑な細菌群集が形成されていることが明らかとなった。しかしながら、いずれの担体においてもこれらの T-RF の多くが検出されており、担体の種類による明確な傾向は判断できなかった。一方、古細菌の群集構造は、細菌と比べて単純であり、3つの T-RF を検出した。比較した担体のなかでも、特に炭素繊維 (CFT) の担体上において 186bp の T-RF の割合が顕著に大きいことが明らかとなった。16S rRNA 遺伝子のクローン解析では、T-RF が 186bp と推定されるクローンを主に得ており (表3)、このクローンは酢酸資化性メタン菌である *Methanosarcina thermophila* に近縁であると推定した。次に、運転 73 日目の繊維状の担体 (GF、PEF、CFT) の T-RFLP の結果では、発酵液及び担体上の細菌群集は、ポリエチレン繊維 (PEF) と炭素繊維 (CFT) において類似している傾向が見られた。ただし、ガラス繊維 (GF) においても、ポリエチレン繊維 (PEF) と炭素繊維 (CFT) で検出された細菌の多くを検出しており、明確な傾向の差を判断することはできなかった。一方、古細菌の群集構造については、ポリエチレン繊維 (PEF) と炭素繊維 (CFT) を用いた場合において、明らかに 186bp の酢酸資化性メタン菌の割合が高い傾向を確認した (図4)。これは、発酵液よりも特に担体上でより顕著であり、低負荷運転時 (運転 53 日目) の炭素繊維 (CFT) と同様の結果を得た。以上の微生物群集の構造解析から、メタン発酵槽への担体の設置、特に繊維

状の担体の設置により、発酵槽内に特定のメタン菌を維持できる可能性を見いだした。

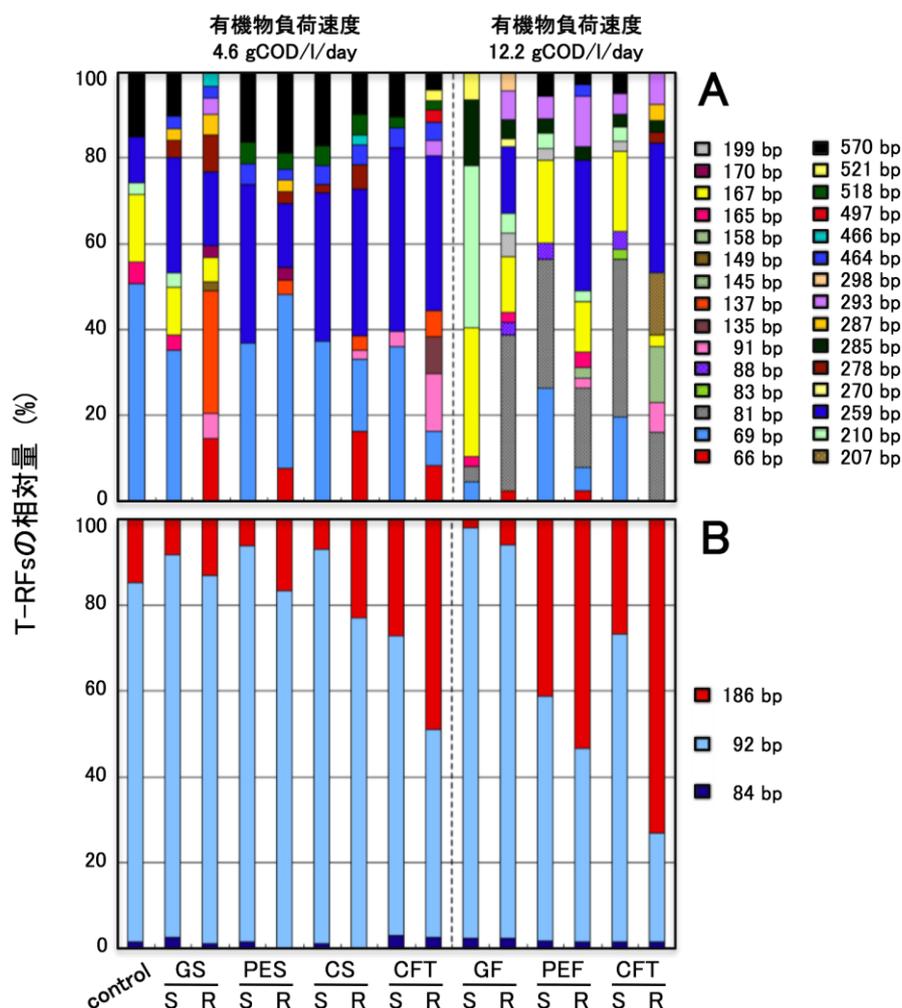


図4 T-RFLP 解析による細菌(A)および古細菌(B)の群集構造

53 日目 (4.6gCODer/L/日) の担体なし(control)、ガラス板(GS)、ポリエチレン板(PES)、炭素板(CS)、炭素繊維(CFT)と 73 日目 (12.2gCODer/L/日) のガラス繊維(GF)、ポリエチレン繊維(PEF)、炭素繊維(CFT)における、発酵液画分(S)と担体付着画分(R)の T-RFLP 結果。解析によって得られた各プロファイルの T-RFs を相対値化して示した。

表3 炭素繊維画分 (OLR 4.6gCOD/L/day) から取得したクローンの数と系統学的特徴付け

| 分類単位 ^a | 獲得数 | 制限断片長 (bp) | 最も近縁な分離菌株 | 相同性 (%) |
|-------------------|-----|------------|--|---------|
| A1 | 21 | 186 | <i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140) | 98 |
| A2 | 1 | 186 | <i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140) | 93 |
| A3 | 4 | 92 | <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> (EF100758) | 100 |
| A4 | 4 | 92 | <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> (AE00066) | 100 |
| 合計 | 30 | | | |

^a 得られたクローンの配列どうしの相同性が 99.5%以上のものは同じ分類単位とした。

2.5.2.3 アンモニアがメタン発酵に及ぼす影響と担体設置の効果

処理対象物によっては発酵槽内に阻害物質(アンモニア)が蓄積し、メタン発酵に悪影響を及ぼす。そこで、処理対象物中にアンモニアが存在することを想定し、アンモニアがメタン発酵に及ぼす影響を把握するために、炭素繊維を担体として設置した固定床発酵槽と担体のない発酵槽を連続的に運転して比較検討した。その結果、固定床式発酵槽では、アンモニア濃度が 3,080mg-N/L まではメタンガス生成はほとんど影響を受けなかったが、アンモニア濃度を 6,070mg-N/L にした場合、ガス生成速度は急激に減少すると共に、ガス中のメタンガス含有率も低下し、アンモニアによってメタン発酵は強く阻害された。

一方、担体のない発酵槽では、アンモニア濃度が 380mg-N/L まではメタンガス量は同程度であったが、アンモニア濃度 850mg-N/L 以上において、VFA の蓄積量が増加すると共に、ガス生成速度とメタンガス含有率の急激な減少が見られ、固定床発酵槽よりもアンモニアによる阻害の影響が大きかった。

以上の結果、担体を設置することにより、アンモニアがメタン発酵に及ぼす影響を軽減できることを示した。

2.5.2.4 固定床メタン発酵槽に及ぼす担体の効果のまとめ

担体を発酵槽に設置した場合、その担体の種類によっては、高負荷時のメタン発酵の安定性に寄与することを明らかにした。特に空隙率の高い繊維状の担体でその効果が大きい傾向があった。発酵槽内の微生物群集の解析成果から、(1)繊維状の担体の微生物量が大きく、発酵槽内の微生物濃度が大きくなること、(2)担体上のメタン菌量の割合が高い傾向があること、(3)繊維状の担体では古細菌のなかで特に酢酸資化性メタン菌の優占率が高い傾向があることを明らかにした。担体設置によって発酵槽内の微生物量が大きくなることは、短い HRT における有用微生物群の系外への流出に対して有効である。また、担体上のメタン菌量の割合が高くなることは、特に増殖の遅いメタン菌の発酵槽内での維持に効果があり、さらに、担体上で酢酸資化性メタン菌

など特定のメタン菌の優占化は、メタン発酵で酸敗をもたらす酢酸の蓄積低減に寄与する可能性がある。従って、適切な担体の発酵槽への設置は、廃棄物のメタン発酵処理に有効な微生物群（すなわちデザイン化微生物群）の維持に有効であり、高負荷時における発酵槽の安定化に効果的であることを見いだした。また、発酵液中に高濃度のアンモニアが存在する場合、メタン発酵が阻害されることが知られている。本研究では、炭素繊維を担体として設置することにより、担体を設置していない発酵槽と比較してより高い濃度のアンモニアが存在してもメタン発酵が可能であることを示し、メタン発酵に対する担体の効果として、メタン発酵の阻害物質であるアンモニアの影響軽減の可能性を示した。

2.5.3 微生物群の電気制御による安定化技術の開発

2.5.3.1 通電がメタン菌のメタン生成活性に及ぼす影響

微生物の培養において、発酵槽や培養槽に電極を設置し電極に通電することにより、微生物の増殖量、増殖速度または酵素活性が影響を受けることが、いくつかの微生物で確認されている。これらの効果に対する電極への通電の機構は明らかとなっていないが、メディエータを介しての電子（エネルギー）の授受、または発酵液や培養液中の微生物に適した酸化還元状態の調整などが考えられている。ここでは、メタン発酵における発酵槽への通電による制御・安定化の可能性を検討するために、メタン発酵においてメタン生成という重要な役割を果たすメタン菌に着目し、代表的な純粋菌株（水素資化性メタン菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* 及び酢酸資化性メタン菌 *Methanosarcina thermophila*）を用いて通電の効果を検討した。

水素資化性メタン菌を用いた検討では、電極として炭素板を設置した発酵槽を用い、培養液として 200ml 容量の *Mt. thermautotrophicus* 用培地 (DSMZ medium 119) にメディエータとして 0.5mM anthraquinone 2,6-disulfonate (AQDS) を添加したものをを用いた。電流値が安定するまで培地中の電極に通電し、その後濃縮した *Mt. thermautotrophicus* 懸濁液を接種し、通電を継続しながら、55°C でメタン生成量を測定した。電極の設定電位は、通電なし（硫化ナトリウム及びシステインを添加により約 -0.45V に調整）及び +0.4V、-0.1V、-0.4V、-0.8V の計 5 つの条件 (vs Ag/AgCl、以下同様) で行い、設定電位が *Mt. thermautotrophicus* のメタン生成活性に及ぼす影響を比較した。その結果、図5のメタン生成の相対活性の電位依存性に示すように、設定電位を -0.8V とした場合に他の条件と比べてメタン生成活性が高く、通電なしの場合と比較して 3.4 倍向上することを確認した。一方、設定電位を -0.4V とした場合、メタン生成活性は通電なしの場合の 6 割程度となり、さらに設定電位を +0.4V 及び -0.1V とした場合、メタン生成活性はほとんど見られなくなり、対照区である通電なしと比較してメタン生成活性は抑制される傾向を確認した。これらの結果は、発酵槽に設置した電極への通電が *Mt. thermautotrophicus* のメタン生成に影響することを示し、設定電位によってはメタン菌の活性を向上させることが可能であることを意味している。なお、設定電位を -0.8V とした場合、菌の接種後、電極に流れた電流の絶対値は 1mA 以下と低く維持されていたことから、メタン菌に対する通電の効果に関しては、メディエータを介しての微生

物への電子の供給による可能性は低く、培養槽内の酸化還元状態の調整による可能性が高いと考えられた。以上の結果より、純粋培養したメタン菌 *Mt. thermautotrophicus* について、培養槽に設置した電極の設定電位を制御することにより、メタン生成活性が増大することを明らかにし、メタン発酵に対する通電効果の可能性を見いだした。

一方、*Ms. thermophila* を用いた検討においては、通電なし、設定電位+0.0V、-0.3V、-0.6V および-0.8V の条件で実施したが、同じ条件での培養においてもガス発生量にばらつきが大きく、通電の効果の有無を明確に評価できる結果は得られなかった。

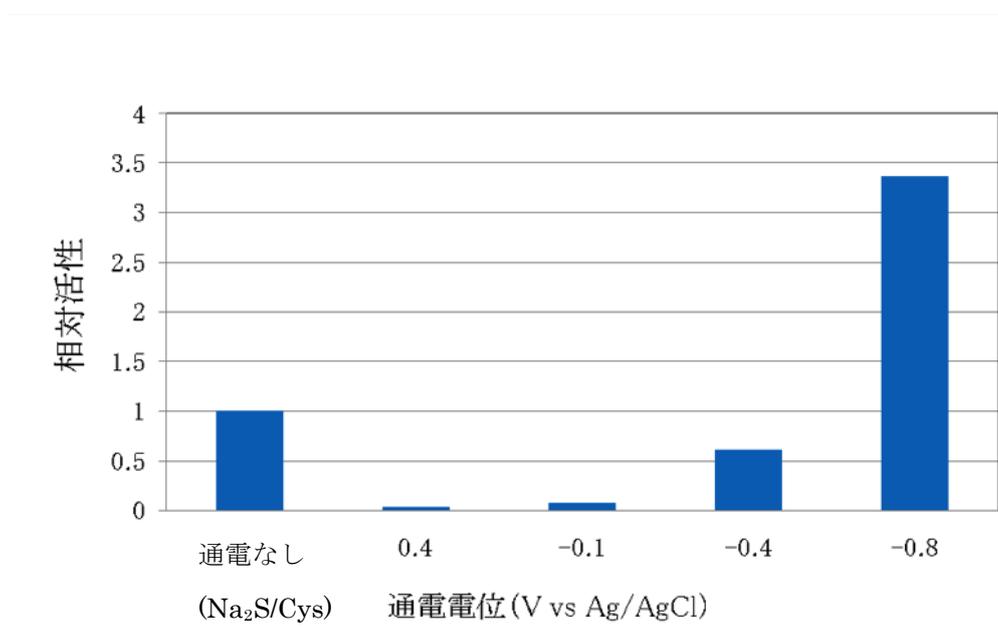


図5 メタン生成活性の電位依存性

2.5.3.2 メタン発酵における通電による処理能力への影響評価

2.5.3.1 において、1 種類ではあるもののメタン生成を担うメタン菌を用いて、発酵槽に設置した電極への通電の効果の可能性を示した。そこで、複合微生物系であるメタン発酵において通電効果を検討するために、発酵槽に電極を設置したH型の2槽式の通電型メタン発酵槽(図6)を用いて運転を行った。通電型メタン発酵槽は、メタン発酵を行う発酵槽内に作用極として炭素板、さらに参照電極として銀塩化銀電極を設置し、陽イオン交換膜を介した反対側の槽には塩化ナトリウム溶液を入れ、対極として炭素板を設置している(図6)。メディエータとして 0.2mM AQDS を添加した10%ドッグフードスラリーを模擬廃棄物とし、1日1回HRTに応じた適量を交換しながら、55°Cで連続運転を行った。OLRを段階的に増加するために、HRTを段階的に短くして最大72日間運転した(図7)。電極への通電条件は、対照区である通電なし(control)及び設定電位を+0.0V、-0.3V、-0.6V、-0.8Vとした計5条件とし、負荷量に対する安定性を比較した。なお、通電

なし(control)における発酵槽内に設置した炭素板電極の電位は-0.47Vであったため、設定電位を+0.0V、-0.3Vとして通電した場合、作用極はアノードとして作用しており、設定電位を-0.6V、-0.8Vとした場合、逆にカソードとして作用していた。

各発酵槽のガス生成速度(図8)から、運転開始後40日目(OLR 20.0gCODcr/L/日)までは、いずれの条件においてもガス生成速度に大きな差は見られず、安定した処理が行われていたことが確認された(図8)。しかし、OLRを26.9gCODcr/L/日に増加すると、通電なし(control)、設定電位+0.0V及び-0.3Vでは、酢酸を中心とするVFAの蓄積(216~546mM)が見られ、ガス生成速度の急激な減少が見られた。一方、設定電位-0.6V及び-0.8Vでは、この負荷量でも安定したガス生成が見られ、さらにOLRを31.8gCODcr/L/日に増大しても、滞留時間の3倍以上の期間(14日間)、ガス生成速度はほぼ一定の値(平均値:7,650 ml/L/日)で推移した。このとき、生成ガス中のメタン含有率、COD除去率及びSS除去率もそれぞれ55-57%、58-59%及び40-45%とほぼ一定に維持されており、メタン発酵が安定していたことを示す結果を得た。従って、発酵槽に設置した電極への設定電位-0.6V及び-0.8Vの通電が、メタン発酵の高負荷時の安定化に寄与することを見いだした。なお、設定電位-0.6V及び-0.8Vで通電した場合、OLRによっても変動するものの、作用極への電流の絶対値は、1日の平均で約250 μ Aであり、メタン菌の純粋菌株を用いた検討(2.5.3.1)と同様に電極間の電流値は小さい値であった。仮に電極に流れた電流がすべてメタン生成に関与したと仮定して、 $\text{CO}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ から発生するメタン量を試算すると約2.5mL/L/日となる。この値は、ガス生成速度とメタン含有率から試算される生成メタン量と比較して極めて少ないことから、電極への通電の効果が発酵液の酸化還元状態の調整による効果である可能性を支持する。

以上より、設定電位+0.0V及び-0.3Vにした場合、通電なしの場合と同様にOLR 26.9gCODcr/L/日において、メタンガス生成速度と有機物分解速度の低下が見られたため、発酵槽に設置した電極に通電する効果はないと判断された。これに対して、設定電位-0.6V及び-0.8Vでは、OLR 31.8gCODcr/L/日の高負荷条件においても安定的なメタンガス生成を確認し、メタン発酵槽の安定した運転が可能であることを見いだした。

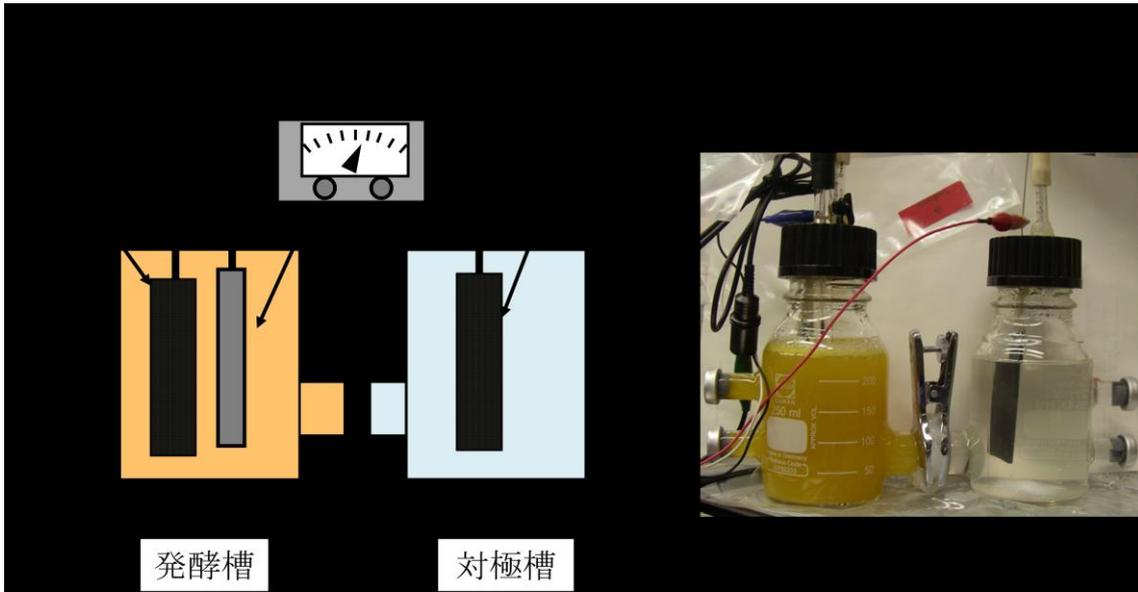


図6 実験装置の(A)模式図及び(B)写真

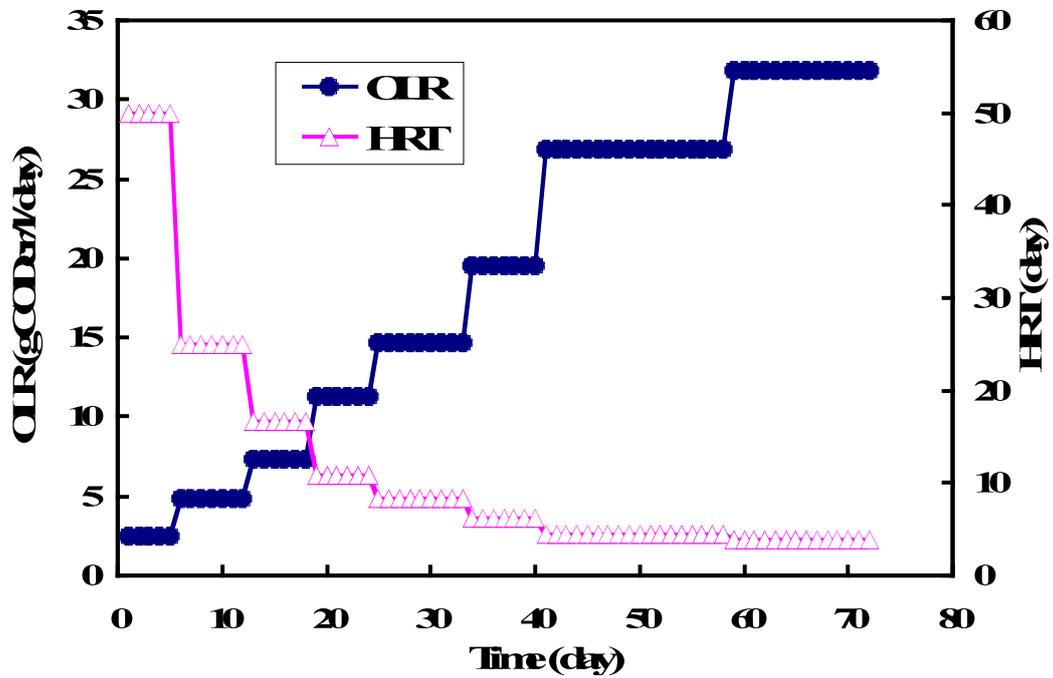


図7 有機物負荷量(OLR)と水理的学的滞留時間(HRT)の経時変化

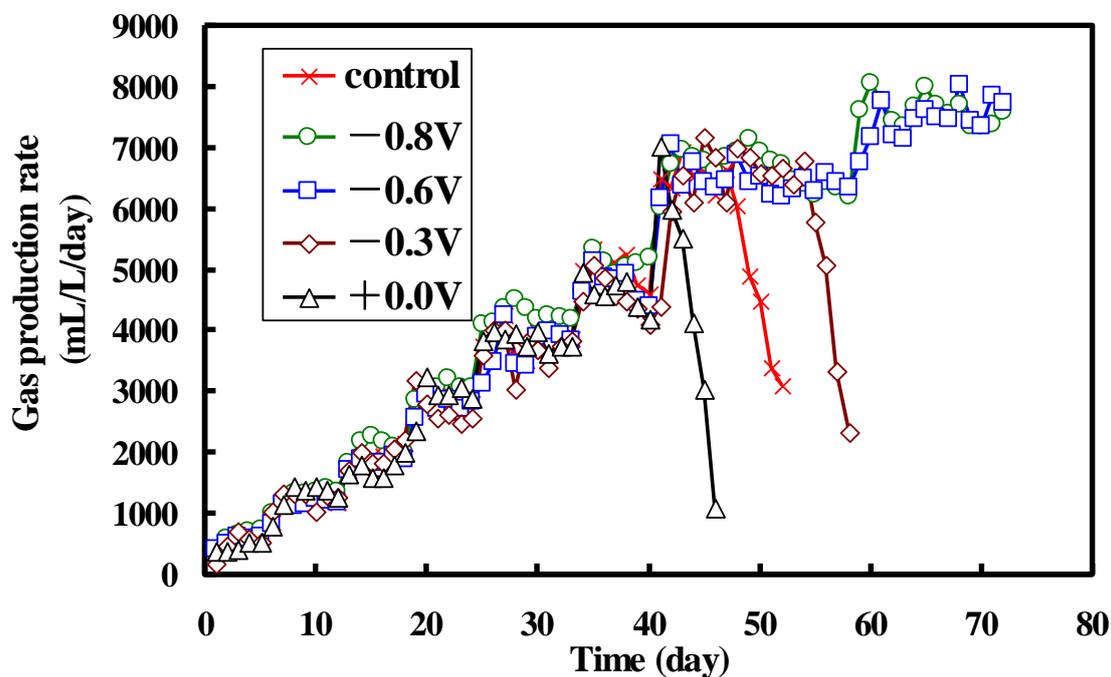


図8 ガス生成速度の経時変化

2.5.3.4 発酵槽内の微生物群集の解析

各発酵槽内の発酵液中と電極上の微生物量を評価するために、OLR 26.9gCODcr/L/日の条件の発酵液及び電極上の微生物について、DNAを抽出しDNA量の定量を行った。なお、実験途中でガス生成速度の急激な減少が見られた実験区については、実験終了時の試料を対象とした。その結果、発酵液中画分については、すべての条件で、全菌及びメタン菌のDNA量は同程度であることが明らかとなった(表4)。一方、電極上における全菌及びメタン菌のDNA量は、設定電位を-0.6V 及び-0.8 V にした場合、通電なし(control) 及び設定電位を-0.3V にした場合と比較して、電極上において全菌及びメタン菌(メタン生成に関与)のDNA量が多い傾向があった。しかしながら、発酵液中の微生物量と比較すると電極上の微生物量は低く、メタン発酵への関与は小さいと判断した(表4)。なお、設定電位を-0.6V 及び-0.8V にした場合については、OLR 31.8gCODcr/L/日(HRT 3.8 日)で運転した試料についても検討を行ったが、電極上と発酵液中の全菌及びメタン菌のDNA量は、OLR 26.9gCODcr/L/日で運転した場合と同程度に維持されていた。

表4 各発酵槽内の電極上と発酵液中の全菌のDNA量、メタン菌のDNA量、及び全菌のDNA量に対するメタン菌のDNA量の割合

(有機物負荷量 26.9gCODcr/L/日、水理学的滞留時間 4.5 日)

| 設定電位 (V) | 画分 | 全菌 (コピー数/発酵槽) | メタン菌 (コピー数/発酵槽) | メタン菌/全菌 (%) |
|----------|----|--------------------------------|--------------------------------|-------------|
| control | 浮遊 | $(1.2 \pm 0.1) \times 10^{13}$ | $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | 9.2 ± 0.9 |
| -0.8 | 浮遊 | $(5.0 \pm 0.4) \times 10^{12}$ | $(5.1 \pm 0.3) \times 10^{11}$ | 10.1 ± 0.9 |
| -0.6 | 浮遊 | $(1.7 \pm 0.2) \times 10^{13}$ | $(2.9 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | 17.4 ± 1.6 |
| -0.3 | 浮遊 | $(9.7 \pm 0.7) \times 10^{12}$ | $(1.3 \pm 0.1) \times 10^{12}$ | 13.7 ± 1.0 |
| control | 付着 | $(5.2 \pm 0.7) \times 10^8$ | $(5.2 \pm 0.4) \times 10^7$ | 10.1 ± 1.2 |
| -0.8 | 付着 | $(9.3 \pm 0.2) \times 10^{10}$ | $(6.6 \pm 0.2) \times 10^9$ | 7.1 ± 0.3 |
| -0.6 | 付着 | $(4.5 \pm 0.5) \times 10^{10}$ | $(3.1 \pm 0.2) \times 10^9$ | 6.9 ± 0.7 |
| -0.3 | 付着 | $(6.0 \pm 0.4) \times 10^9$ | $(5.3 \pm 0.3) \times 10^7$ | 8.8 ± 0.7 |

次に、通電および通電していない発酵槽の微生物群集構造を電極の設定電位や発酵槽の処理能力と合わせて評価するため、抽出したDNA試料に関して、細菌及び古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的として、T-RFLP 解析 (図9) およびクローン解析 (表5、表6) を行った。T-RFLP 解析から、すべての発酵槽の電極上と発酵液中の細菌及び古細菌の菌叢パターンは類似しているという結果を得た。細菌においては、主要な T-RF は 262bp であり、細菌のクローン解析 (49 クローン) においても、T-RF が同一と予想されるクローンが高頻度 (約 60%) に得られた。このクローンは、チオ硫酸還元能を有し様々な資化能を持つとされる Thermotogae 門内の細菌に、最も高い相同性を示した。古細菌の T-RFLP のパターンは細菌の群集構造に比べて単純であり、全ての発酵槽の電極上と発酵液中において、群集は4種の T-RF から構成された。これらの構成種を明らかにするために、クローン解析 (40 クローン) を行ったところ、4 種のクローンが検出され、そのうち 3 つが水素資化性メタン菌である *Methanobacterium formicicum*、*Methanothermobacter thermautotrophicus*、*Methanoculleus thermophilus* に高い相同性を示し、1 つが酢酸資化性のメタン菌である *Methanosarcina thermophila* に近縁なものとして検出された。なお、得られたクローンの相対的な割合は、T-RFLP の結果と同様の傾向を示した。

以上の結果、発酵液中及び電極上の細菌と古細菌の群集構造は、構成種の割合に差は見られるものの、通電の有無、および設定電位によって顕著な差は無いことが明らかとなった。特に古細菌 (メタン菌) においては、いずれの条件のメタン発酵槽でも 4 種類の優占種が検出され、同様の群集構造であったと判断された。

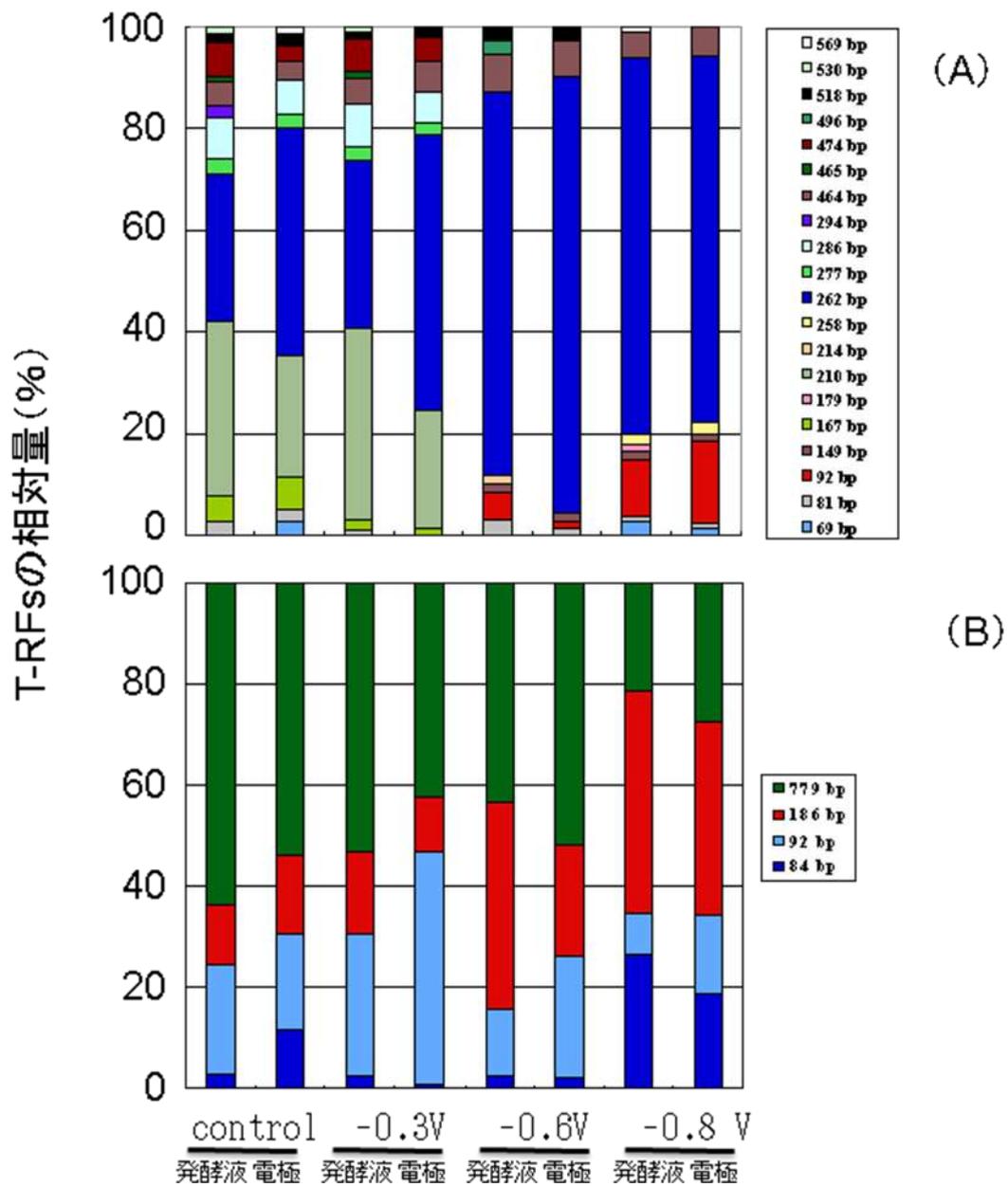


図9 T-RFLP 解析による細菌(A)および古細菌(B)の群集構造
 通電なし(control)と-0.3V~-0.8Vに通電した発酵液と電極上の T-RFLP 結果。解析によって得られた各プロファイルの T-RFs を相対値化して示した。

表5 電極(-0.6V)から取得した細菌クローンの数と系統学的特徴付け

| 分類単位 ^a | 獲得数 | 制限断片長 (bp) | 最も近縁な分離菌株もしくは未培養細菌 | 系統学的分類 | 相同性 (%) |
|-------------------|-----|---------------|--|---------------|------------|
| B1 | 29 | 262 | uncultured Thermotogae bacterium (EU639270) | Thermotogae | 99 |
| B2 | 9 | 95 | uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium (EU638999) | Bacteroides | 91 |
| B3 | 6 | 150 | uncultured bacterium (AB428539) [MSW cluster] | Firmicutes | 99 |
| B4 | 4 | 311 | uncultured bacterium (AB286973) [MSW cluster] | Firmicutes | 99 |
| B5 | 1 | 286 | <i>Anaerobaculum mobile</i> (AJ243189) | Synergistetes | 99 |
| 合計 | 49 | | | | |

^a 得られたクローンの配列どうしの相同性が99.5%以上のものは同じ分類単位とした。

表6 電極(-0.6V)から取得した古細菌クローンの数と系統学的特徴付け

| 分類単位 ^a | 獲得数 | 制限断片長 (bp) | 最も近縁な分離菌株もしくは未培養細菌 | 系統学的分類 | 相同性 (%) |
|-------------------|-----|---------------|--|---------------------------|------------|
| A1 | 21 | 779 | <i>Methanobacterium formicicum</i> (DQ649309) | <i>Methanobacteriales</i> | 98 |
| A2 | 10 | 92 | <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> (EF100758) | <i>Methanobacteriales</i> | 100 |
| A3 | 7 | 186 | <i>Methanosarcina thermophila</i> (M59140) | <i>Methanosarcinales</i> | 100 |
| A4 | 2 | 84 | <i>Methanoculleus thermophilus</i> (EF118904) | <i>Methanomicrobiales</i> | 98 |
| 合計 | 40 | | | | |

^a 得られたクローンの配列どうしの相同性が99.5%以上のものは同じ分類単位とした。

2.5.3.4 通電による発酵槽の性能及び微生物群集への効果のまとめ

メタン発酵槽内の微生物群集に対して、電極の設定電位を通電なしのメタン発酵槽内の酸化還元電位よりも負に制御することにより、高負荷条件においても安定したメタンガス生成、高い有機物除去能、VFAの蓄積が少ない等、発酵槽の能力として優れた性能を発揮し、メタン発酵槽の安定化に対して効果があることが明らかとなった。その際の発酵槽内の微生物群集を調べたところ、発酵液中の微生物量及びその群集構造に関して、通電の有無、設定電位による顕著な傾向は確認できなかった。これらの結果から、発酵槽に設置した電極への通電は、メタン発酵に関わる微生物群にとって適した環境への調整に関与し、高い有機物負荷においても発酵槽内の有用微生物群を維持することで、安定したメタン発酵を可能にしたものと推測する。このように、発酵槽に設置した電極に対して適切な電位制御を行うことで、発酵槽内の有用微生物群の維持を可能とし、高負荷条件での安定化技術の開発に成功した。

2.5.4 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

2.5.4.1 通電型固定床メタン発酵槽の形状の検討

2.5.2 及び 2.5.3 では、微生物群担体の設置と通電による制御によって、メタン発酵の高負荷運転の安定化に寄与するという結果を得た。本章では、より高負荷での運転の安定化のために、微生物群担体と電気制御を組み合わせた通電型固定床メタン発酵槽を開発し、その性能評価を行った。通電型固定床メタン発酵槽では、有用な微生物群の保持と通電可能な電気化学的性質の両方を考慮した担体が必要である。2.5.2 において、微生物群の保持には炭素繊維などの空隙率の高い繊維状の担体が適しているという結果を得ている。しかし、電気化学的性質という観点では、材質的に通電が可能である炭素繊維でもわずかな電流しか流れない。そこで、炭素繊維に炭素板を接触させ、炭素繊維上に固定化された有用微生物群に隣接した炭素板電極を介して通電する微生物群担体を構築し、通電型固定床メタン発酵槽の実証に供試した。一方、2.5.3 で検討した通電型のメタン発酵槽は、陽イオン交換膜を介してメタン発酵を行う発酵槽と対極槽が繋がった H 型の構造をしている (図6)。このような構造では、対極槽の容積や設置面積やリアクター容積が大きくなるため、今後のスケールアップや本研究の目的であるメタン発酵槽のコンパクト化の妨げとなる。そこで、発酵槽の形状を単純化するために、図10に示すように、メタン発酵槽中心部に陽イオン交換膜を介した対極槽を設置する構造とし、発酵槽に対して対極槽の容積を小さくすることで、発酵槽容積及び設置面積が小さくなるようにした。なお、本研究では、従来のメタン発酵槽より約 3 倍の高い有機物負荷量において廃棄物を安定処理することで、発酵槽の 50% コンパクト化を目指している。ここでは、生ごみ処理を主体とした従来のメタン発酵設備の負荷量を平均で約 8.5gCOD_{cr}/L/日と想定し、その 3 倍の負荷量である約 25.5gCOD_{cr}/L/日以上安定処理を通電型固定床メタン発酵槽の目標とした。

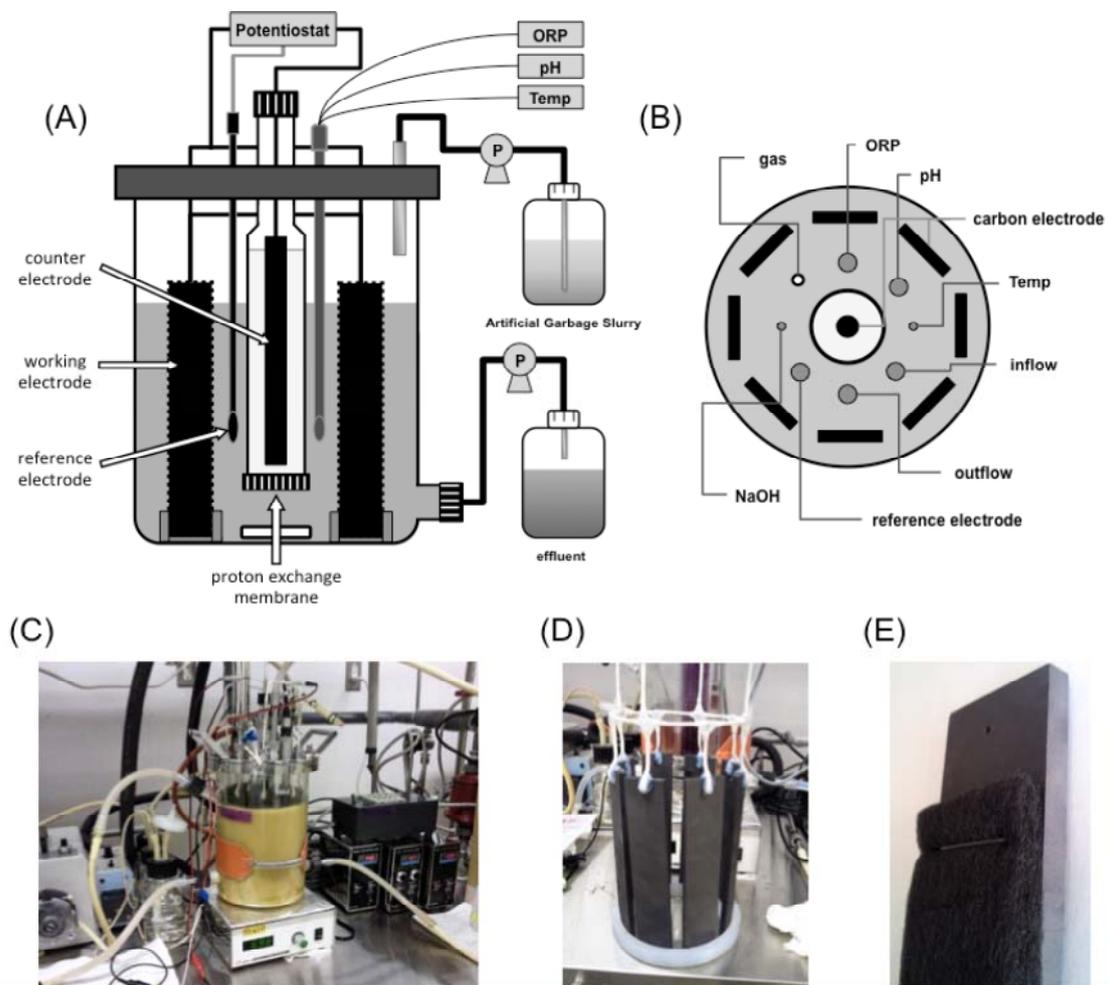


図 10 通電型固定床メタン発酵槽の(A) 模式図、(B) 配置図、(C) 装置全体の写真、(D) 作用電極の全体写真、(E) 炭素繊維と電極を接触させた微生物群担体の拡大写真

2.5.4.2 通電型固定床メタン発酵槽の処理能力の評価

図10に示した形状の4.0L容量の通電型固定床メタン発酵槽(bioelectrochemical packed-bed reactor; BPR)を作成し、その処理性能を評価するために模擬廃棄物(模擬生ごみ)として10%ドッグフードスラリー(AQDS未添加)を用いて、55℃、設定電位-0.8Vを印加しながら連続運転を行った。また、処理性能を比較するために、電極として炭素板のみを設置した発酵槽(通電型メタン発酵槽 bioelectrochemical reactor: BR)に対して設定電位-0.8Vを印加した試験も実施した。運転時における有機物の負荷は、一定流量に設定されたポンプとタイマーを用いて流入/流出するドッグフードスラリー/発酵液の量を調整することで行い、OLR 13.4 gCOD_{cr}/L/日(HRT 10日)から最終的にはOLR 89.3 gCOD_{cr}/L/日(HRT 1.5日)まで段階的に上げた(図11)。BRに

おいては、OLR 33.5 gCOD/L/日 (HRT 4.0 日) までの有機物負荷の運転において、安定したガス発生速度(約 10 L/L/日)、COD 除去率(65%)、SS 除去率(50%)及びガス組成(メタンガス 60%)を確認した(図12)。しかし、OLR 38.3 gCODcr/L/日にした場合、ガス発生量が減少する傾向がみられたため、BR において安定したメタン発酵は OLR 33.5 gCODcr/L/日までと判断した。一方、BPR においては、さらに高い OLR(最大 89.3 gCODcr/L/日)に対しても安定したガス生成を確認し、より高い有機物負荷運転におけるメタン発酵の安定化に成功した。このとき、COD 除去率、SS 除去率は低い OLR のときと比べて低下する傾向はあるものの、それぞれ 62.5%及び 54.6%と高い値が維持されていた。また、BPR においては BR に比べて運転期間全般に VFA が低く維持されるという傾向がみられた。BPR では、最も OLR が高い場合における HRT は 1.5 日であり、固形の有機物の処理を目的としたメタン発酵としては極めて短い HRT での安定した処理が可能となることを見いだした。微生物群担体と対極間を流れた電流値は平均約 6.3mA/reactor で、微生物群担体と対極間の電位差は有機物負荷量によって大きな変動はなく、約 1.8V であった。2.5.3.2 で計算したように、電極に流れた電流がすべてメタン生成に関与したと仮定して、電極(微生物群担体)から発生するメタン量を試算すると約 6.6mL/L/日となり、実際に HRT1.5 日で発生したメタン量(9.4L/L/日)に比べて非常に小さいことが確認された。

以上の結果から、炭素繊維を担体としその担体に接触させた炭素板を電極として印加することで有用微生物群担体に対する通電の効果を期待した BPR は、発酵槽に設置した電極に通電した BR と比較して、より高負荷での安定した運転が可能であることを明らかにし、最大で OLR 89.3 gCODcr/L/日 (HRT 1.5 日) という高負荷運転に成功した。

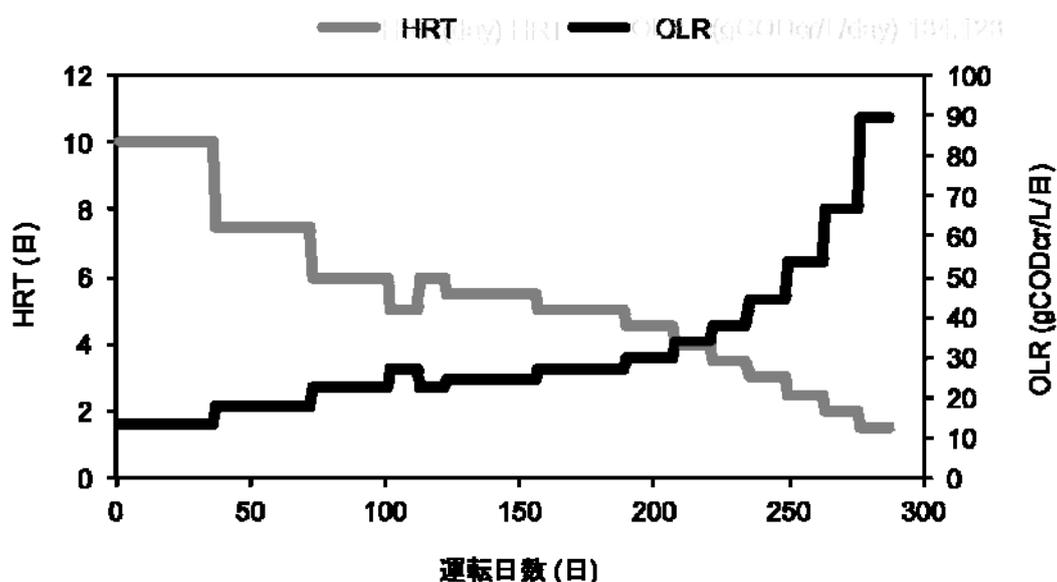


図 11 有機物負荷量 (OLR) と水理的滞留時間 (HRT) の経時変化

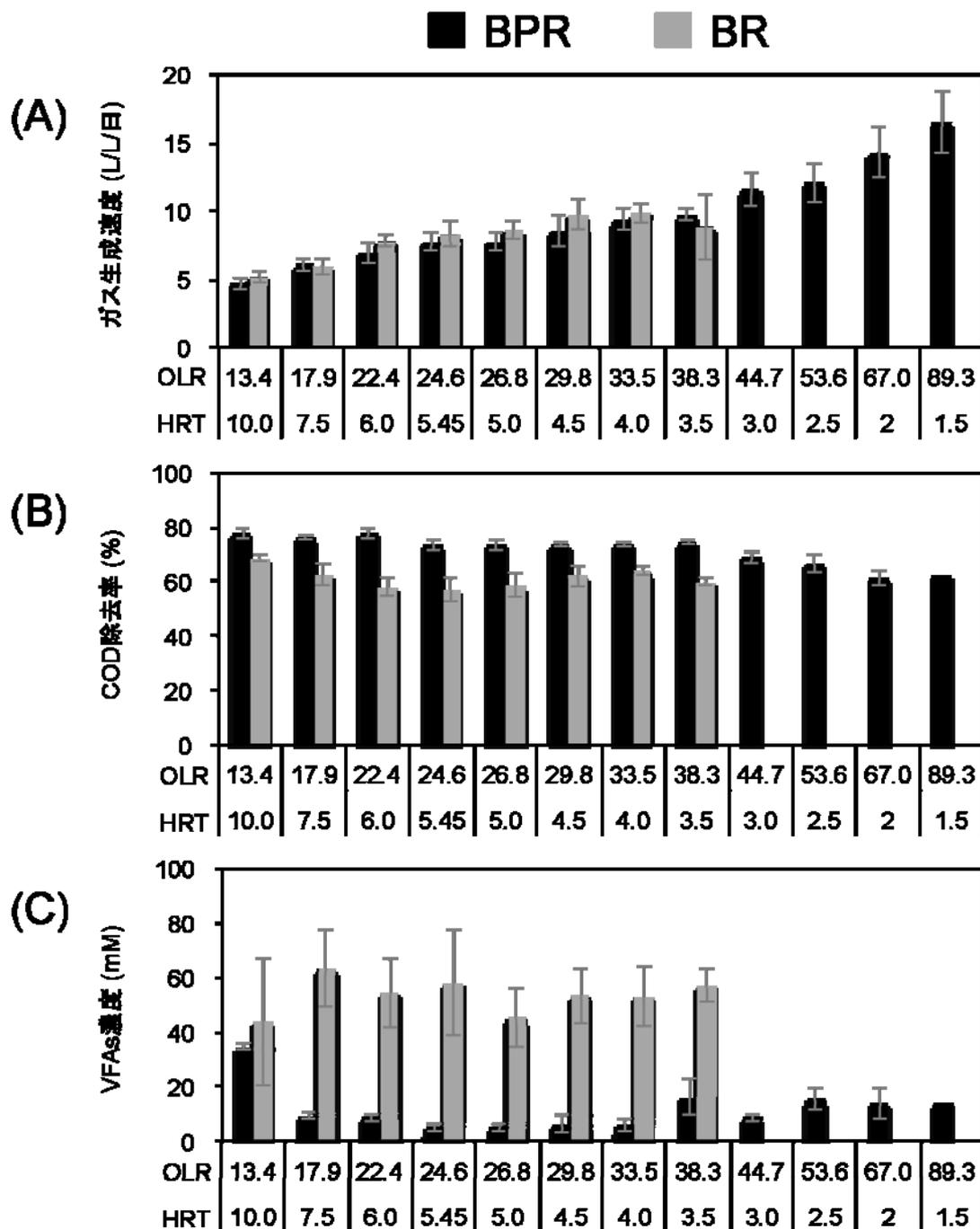


図 12 通電型固定床メタン発酵槽(BPR)、通電型メタン発酵(BR)の各 HRT における(A)ガス生成速度、(B)COD 除去率、(C)VFAs 濃度の平均値

2.5.4.3 通電型固定床メタン発酵槽内の微生物群集の解析

BPR 及び BR の発酵槽内の微生物量を評価するために、代表的な HRT(10 日、4.0 日、3.5 日、2.5 日及び 2.0 日)についての発酵液及び HRT2.0 日(通電型固定床メタン発酵槽)の担体上の微生物を対象に DNA を抽出し全菌及びメタン菌の DNA 量の定量を行った。その結果、いずれ

の発酵槽においても、HRT に関係なく発酵液中の微生物量(全菌及びメタン菌)は同程度であり、HRT2.0 日(通電型メタン発酵槽では3.5 日)においても一定量の微生物が維持されていた(表7)。また、BPR の担体上の全菌は発酵槽あたり 3.4×10^{12} copies であり、HRT2 日の発酵液(1.5×10^{13} copies)と比較すると若干低いものの、高密度で担体に維持されていたといえる。また、担体上のメタン菌量は全菌に対して同じオーダーで検出されており、2.5.2 で得られた結果と同様に担体上でメタン菌の割合が高くなるという結果を得た。

次に4.0L 容量のBPR およびBR の微生物群集の構造を調べるため、発酵液からゲノムDNA を抽出し、細菌と古細菌それぞれの16S rRNA 遺伝子を標的としたT-RFLP 解析を行った(図13)。細菌のT-RFLP 解析の結果、258 bp などのT-RF が検出され、発酵液中の細菌の優占種として確認された。また、古細菌については、92、186bp などのT-RF が優占種として検出され、これまでのクローン解析の結果から、古細菌では酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosarcina* 属や水素資化性メタン生成古細菌 *Methanothermobacter* 属などの存在を確認した。BPR の発酵液中の細菌および古細菌は、その割合に変動はあるものの、OLR を段階的に変化させた運転中、常に優占種として検出された。これは、HRT が短くなくても、発酵液中の微生物群集構造は安定して維持されていたことを示す。また、この結果はBR においても同様であり、ガス発生量の低下が見られたHRT3.5 日を通して、微生物群集の構造に顕著な変化はなかった。

以上の結果、構成比や多様性に若干の違いがあるものの、BPR 及びBR においては有機物の負荷量による発酵槽中の微生物構造に大きな差はなく、比較的負荷の低い場合と同様の微生物群集を維持していることが明らかとなった。

表7 通電型固定床メタン発酵槽(BPR)、通電型メタン発酵槽(BR)の各HRT における全菌のDNA 量、メタン菌のDNA 量
担体付着画分は、BPR のHRT2.0 日における解析結果を示した。

| 全菌 | HRT 10d | HRT 4.0d | HRT 3.5d | HRT 2.5d | HRT 2.0d | 担体付着画分 |
|------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | (copies/発酵槽) | | | | | (copies/発酵槽) |
| BPR | $9.6 \pm 0.4 \times 10^{12}$ | $8.7 \pm 0.8 \times 10^{13}$ | $1.3 \pm 0.1 \times 10^{13}$ | $1.2 \pm 0.2 \times 10^{13}$ | $1.5 \pm 0.1 \times 10^{13}$ | $3.4 \pm 0.5 \times 10^{12}$ |
| BR | $1.5 \pm 0.2 \times 10^{13}$ | $2.4 \pm 0.4 \times 10^{12}$ | $2.3 \pm 0.1 \times 10^{12}$ | | | |
| メタン菌 | HRT 10d | HRT 4.0d | HRT 3.5d | HRT 2.5d | HRT 2.0d | 担体付着画分 |
| | (copies/発酵槽) | | | | | (copies/発酵槽) |
| BPR | $2.3 \pm 0.3 \times 10^{12}$ | $2.6 \pm 0.1 \times 10^{12}$ | $4.0 \pm 0.5 \times 10^{12}$ | $3.2 \pm 0.2 \times 10^{12}$ | $4.7 \pm 0.1 \times 10^{12}$ | $1.8 \pm 0.1 \times 10^{12}$ |
| BR | $3.8 \pm 0.1 \times 10^{12}$ | $5.8 \pm 0.4 \times 10^{12}$ | $5.6 \pm 0.4 \times 10^{12}$ | | | |

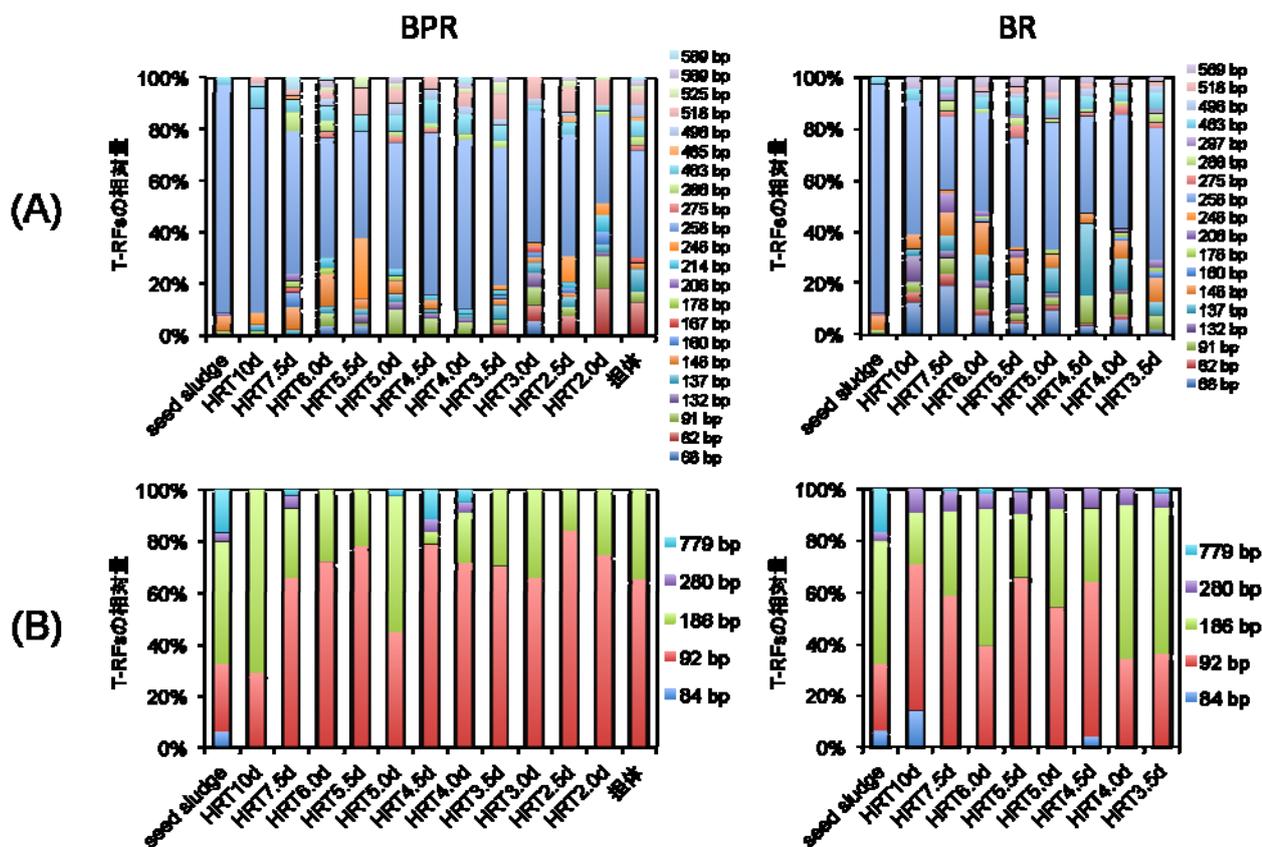


図 13 通電型固定床メタン発酵槽(BPR)と通電型メタン発酵(BR)における(A)細菌群集と(B)古細菌群集の T-RFLP 結果解析

得られた各プロファイルの T-RFs を相対値化して示した。

2.5.4.4 通電型固定床メタン発酵槽の性能及び微生物群集への効果のまとめ

BPR では、微生物を高密度に維持できる炭素繊維を担体とし、その担体に接触させた炭素板を電極として適切な設定電位(-0.8V)に印加することで、担体に対して通電の効果を期待し、高負荷運転におけるメタン発酵の安定化を図った。その結果、最大 OLR 89.3 gCODcr/L/日 (HRT 1.5 日) という高負荷での安定した運転に成功した。BPR では、短い HRT においても処理が安定しており、発酵槽をよりコンパクトにすることが可能である。この負荷量は、本研究における通電型固定床メタン発酵の処理目標の負荷量(25.5 gCODcr/L/日)を大きく越えており、発酵槽の処理能力としては目標負荷量以上での安定したメタン発酵の運転を達成した。

発酵液中の微生物量及び微生物群集の解析から、BPR 及び BR においては有機物の負荷によって微生物量及び微生物群集の構造に顕著な違いは見られないことが明らかとなった。一方で、BPR では、微生物群担体上には高密度の微生物群が確認された。有機物負荷量に対する安定

性に関するBPRとBRの差は、この担体上の高密度の微生物群の影響であると思われる。通電型固定床メタン発酵槽では、発酵槽に固定床を設置し、さらに固定床への通電による制御を行ったが、これらの組み合わせはメタン発酵の処理の効率化に対して相乗効果があるといえる。なお、微生物群担体への通電による制御によって電極間に流れた電流値は非常に小さいことが確認され、微生物群担体への通電の効果は、微生物群担体の酸化還元電位の調整によるものであると推測された。

2.5.5 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

2.5.5.1 メタン発酵の技術を立証するための実廃棄物の選定

2.5.4 までに、メタン発酵に有用な微生物群が維持された担体(デザイン化微生物群担体)に通電による電位制御を行うことで、高負荷時にも安定的に模擬廃棄物を処理できることを示し、メタン発酵槽における電気によるデザイン化微生物群担体の制御技術を実証した。ここでは、実廃棄物による通電型固定床メタン発酵の有効性を検証することを目的とし、対象となる実廃棄物の選定を行った。実廃棄物の候補として、3箇所のメタン発酵槽(消化槽)を有する処理場の消化槽流入濃縮下水汚泥を検討した。それぞれの試料についてSS、揮発性浮遊物質量(VSS)などを分析し、有機物濃度の点から適否を評価した。各試料のSSおよびVSSの分析結果は、それぞれ8.6, 53.2, 35.2 g/L および8.6, 41.3, 18.2 g/L となり、供試された実廃棄物によって含有する有機物濃度が大きく異なっていた。通電型固定床メタン発酵は、高いOLRでの安定的な運転が長所であるため、有機物濃度が高い濃縮下水汚泥(Y市北部汚泥資源化センター提供)を選定した。

2.5.5.2 実廃棄物を用いた通電型固定床メタン発酵槽の運転

廃棄物による通電型固定床メタン発酵の有効性を検証するために、選定を行った実廃棄物(濃縮下水汚泥)を用い、4.0L容量の通電型固定床メタン発酵槽の性能評価を行った。処理性能の評価のため、図14に示すようにメタン発酵槽に対して実廃棄物の負荷量を段階的に増大しながら、温度55℃で最大185日間の連続運転を行った。発酵槽としては担体及び電極を設置しない攪拌混合型メタン発酵槽(stirred tank reactor; STR)と、2.5.4で確立した通電型固定床メタン発酵槽を用いた。通電型固定床メタン発酵槽においては、設置した微生物群担体への通電の設定電位を-0.8Vとした条件(BPR)と通電を行わない条件(packed-bed reactor; PR)で運転を行い、処理能力を比較した。各OLRにおけるガス生成量は、OLR 3.6 gCOD_{Cr}/L/日(HRT 20日)においては3種類の発酵槽で差はないが、OLRを段階的に大きくするとガス生成量に顕著な差が生じた(図15)。まず、STRでは、負荷量を大きくしてもガス発生量が増加しなかった。通電を行っていないPRでは、負荷量の増加に伴いガス発生量は増加する傾向は見られるが、その値は全体的にBPRよりも低く、さらにOLRが14.4 gCOD_{Cr}/L/日以上では減少した。これらに対し、設定電位を-0.8VとしたBPRでは、OLRを3.6 gCOD_{Cr}/L/日から段階的に18.0 gCOD_{Cr}/L/日(HRT 4日)まで増大させても、VFAの極端な蓄積もなく(運転中30mM以下に維持)、ガス生成速度も増

大し、この負荷量まで酸敗などの発酵不良は発生せず実廃棄物が安定的に処理されていた。このとき、微生物群担体と対極間を流れた電流値は平均約 8.3mA/reactor、微生物群担体と対極間の電位差は約 1.8V で、模擬廃棄物を用いた場合と大きな違いはなかった。

以上の結果より、実廃棄物である濃縮下水汚泥においても、高負荷時に安定して実廃棄物を処理できることを示す結果を得た。

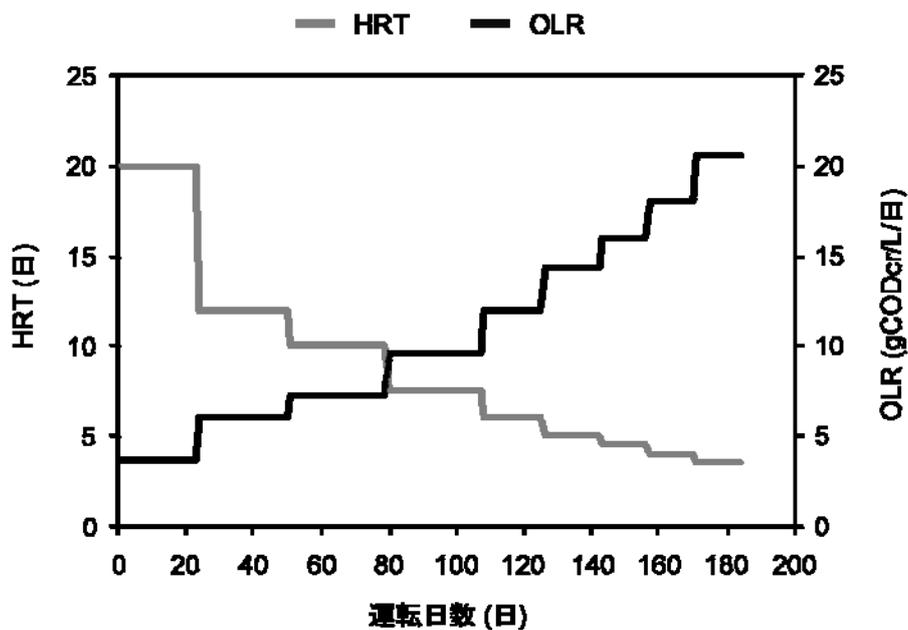


図 14 有機物負荷量(OLR)と水理的滞留時間(HRT)の経時変化

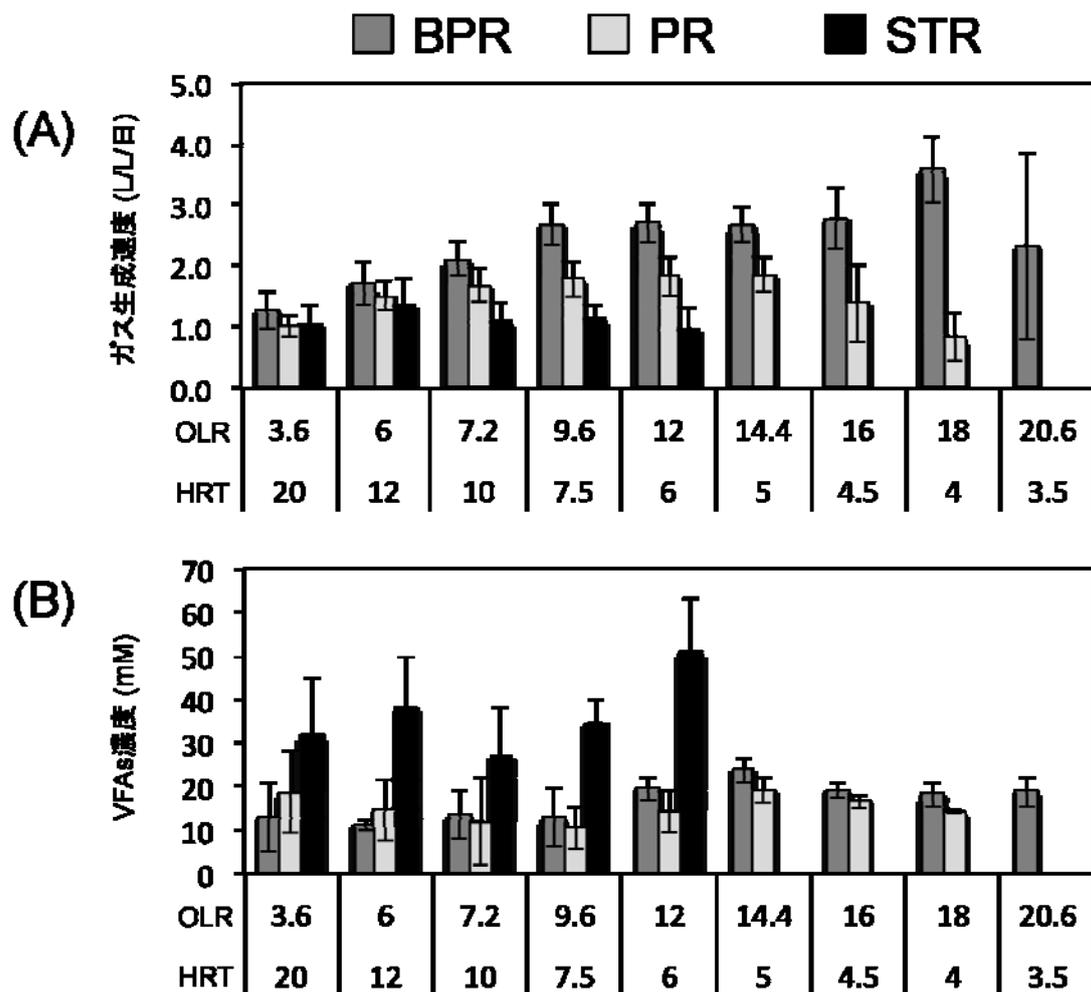


図 15 通電型固定床メタン発酵槽(BPR)、固定床メタン発酵槽(PR)、攪拌混合型メタン発酵槽 (STR)の各 HRT における(A)ガス生成速度、(B)VFAs 濃度の平均値

2.5.5.3 通電型固定床メタン発酵槽内の微生物群集の解析

実廃棄物のメタン発酵における微生物群担体への通電が与える微生物群への影響を評価するために、発酵液から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした T-RFLP 解析(図16)と同領域におけるクローン解析を実施した。その結果、発酵液中の細菌および古細菌を含む微生物群集は、構成割合には差が見られたが、多くの優占種は3種類の発酵槽(BPR, PR, STR)で検出された(図16)。設定電位を-0.8 VとしたBPRの古細菌の解析では、*Methanoculleus* 属や *Methanothermobacter* 属、*Methanobacterium* 属などの水素資化性メタン菌及び酢酸資化性メタン菌である *Methanosarcina* 属が優占的に確認された。特に担体上では酢酸資化性メタン菌の割合が高い傾向がみられ、2.5.2の繊維状の担体上で見られた特徴と同様の結果を得た。*Methanoculleus* 属が優占種として大きな割合を占めており、模擬廃棄物を用い

た実験結果と異なっているが、処理した廃棄物の性状が異なることに起因するものと考えられた。また、OLRを増大しても、ほとんどの優占種は検出され、OLRの変化に対して微生物群の構造は安定していたという2.5.4と同様の結果も得た。

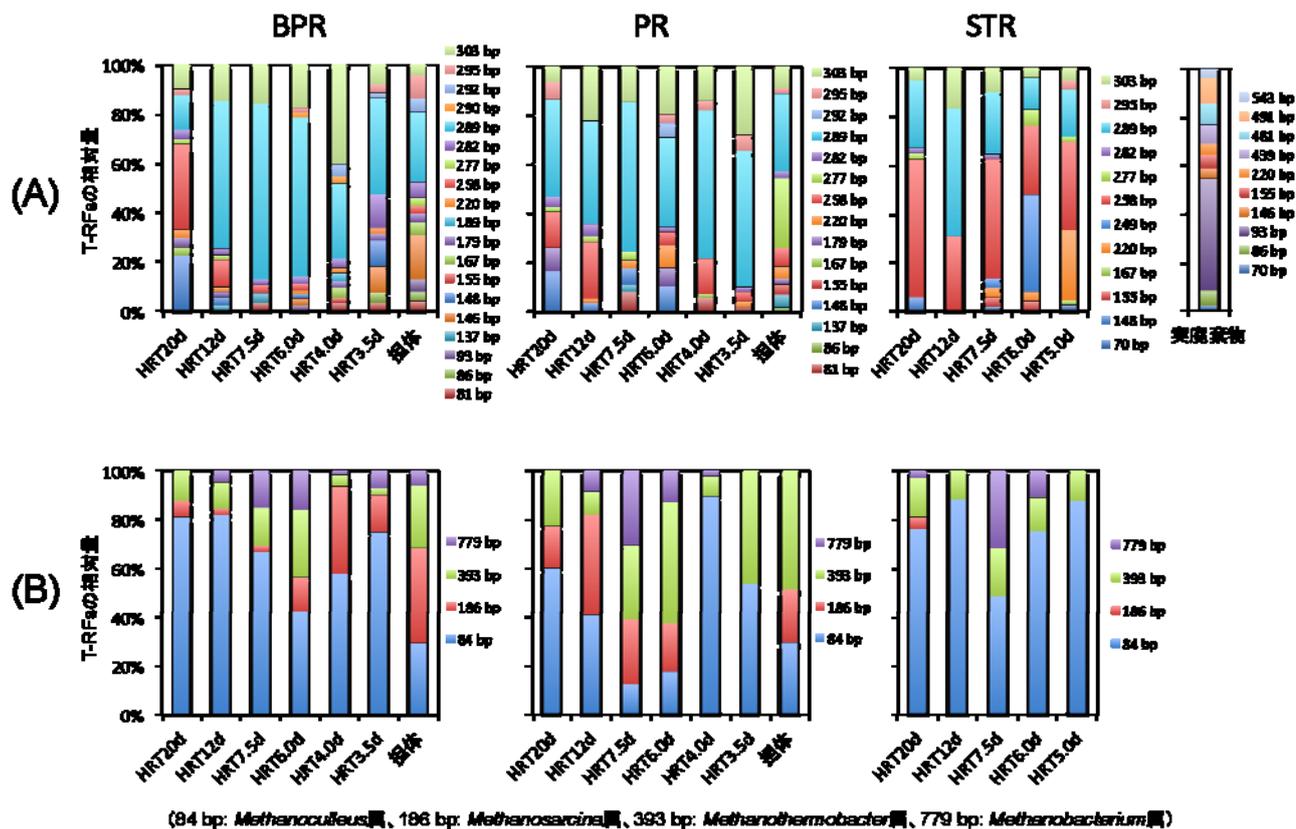


図 16 通電型固定床メタン発酵槽(BPR)、固定床メタン発酵(PR)、攪拌混合型メタン発酵槽 (STR)における(A)細菌群集と(B)古細菌群集の T-RFLP 結果

解析によって得られた各プロファイルの T-RFs を相対値化して示した。担体付着画分の T-RFLP は、HRT4.0 日における結果を担体として示した。「実廃棄物」として、濃縮下水汚泥の細菌の T-RFLP 結果を示した。なお、「実廃棄物」中の古細菌は検出限界以下であった。また、古細菌のクローン解析から予想された T-RF 長に対応する菌名を(B)の下に記載した。

2.5.5.4 実廃棄物による通電型固定床メタン発酵槽の性能評価

本研究で得られた結果と実際の処理施設(実機)における運転実績を比較するために、負荷した実廃棄物の容量あたりのガス生成量(ガス発生倍率)を算出し、文献値と比較した。その結果、設定電位を-0.8 VとしたBPRにおいては、実廃棄物の負荷量が9.6 gCODcr/L/日(HRT 7.5 日)まで、ガス発生倍率はほぼ一定(25.4±6.3~20.1±2.6L/L)であり(図17)、実廃棄物の提供元

設備の文献値(23.3L/L)と同レベルであった。しかし、それ以上の負荷量では、BPRにおけるガス発生倍率は漸減する傾向が見られた。そのため、ガス発生倍率を基準とした場合、BPRにおける実機と同レベルまでのガス生成量を維持できる最大負荷量は 9.6 gCOD_{cr}/L/日 (HRT7.5 日)までとした。なお、55°Cで実施した STR では、HRT20 日までが実機と同レベルのガス発生倍率(21.4±5.9L/L)であった。このとき、負荷した実廃棄物の体積あたりガス発生倍率、COD 除去率、SS 除去率および発酵ろ液中のアンモニア濃度を比較したところ(表8)、実機と同程度またはそれ以上であることが確認された。BPR 及び STR において、COD 除去率及び SS 除去率が高い傾向がみられるが、これは発酵槽内で確認されたスカムの影響と思われる。微生物群担体と対極間に流れた電流値および電極間電位から、微生物群担体を-0.8V に維持するのに要する電力は発酵槽 1L あたり約 6.2mW(年間電力量約 54Wh/年)と求められた。通電型メタン発酵槽の容積を単純に大きくした場合、発酵槽容積 1000m³で約 6.2kW と試算される。通電による制御に必要な電力などは、通電型メタン発酵槽のスケールアップに際して微生物群担体の形状(設置法)や必要量などと共に今後の検討により最適化される余地がある。

以上の結果を踏まえ、BPR の処理能力を評価するために、単純に実機と BPR の HRT を比較すると、BPR では実機に対して約 4 倍の有機物負荷量で処理可能との結果となる。また、発酵温度を考慮して BPR と STR を比較しても、約 2.7 倍の有機物負荷量で処理可能であるとの結果を得た。発酵槽の設置面積を実機に比べて約 50% にコンパクト化するためには、有機物負荷量を実機の約 3 倍にする必要があるが、BPR は十分対応できる処理能力であることが示された。これらの結果から、実廃棄物においても、通電型固定床メタン発酵槽によって高い OLR(短い HRT) で処理が可能であることを実証し、メタン発酵槽を 50% 以下にコンパクト化できる技術を立証した。

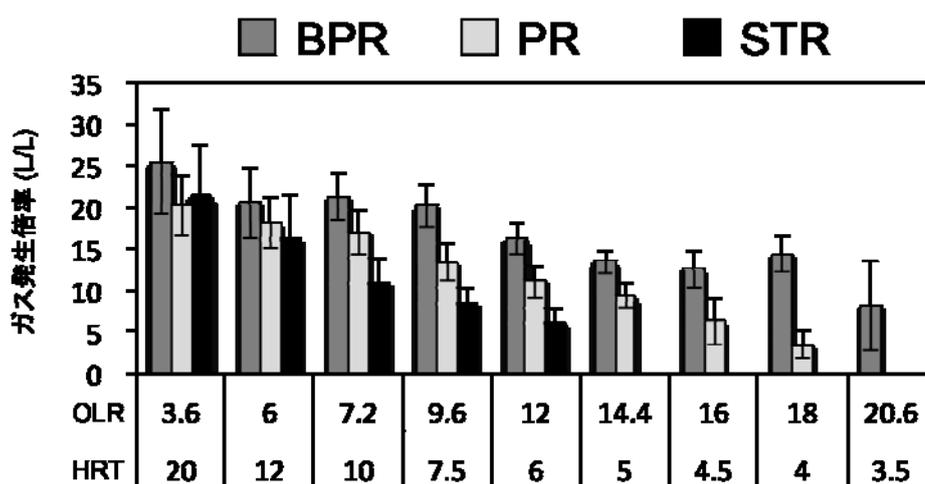


図 17 通電型固定床メタン発酵槽(BPR)、固定床メタン発酵槽(PR)、攪拌混合型メタン発酵槽(STR)の各 HRT におけるガス発生倍率の平均値
HRT 毎に、実廃棄物の容量あたりのガス生成量をガス発生倍率として算出した。

表 8 通電型固定床メタン発酵槽 (BPR)、攪拌混合型メタン発酵槽 (STR) と実機との運転条件と処理性能の比較

| | 運転条件 | | | 処理性能 | | | |
|-----------------------|--------------|------------|----------------------------------|-----------------|----------------|---------------|---|
| | 発酵温度 (°C) | HRT (日) | OLR (gCOD _{cr} /L/日) | ガス発生倍率 (L/L) | COD 除去率 (%) | SS 除去率 (%) | NH ₄ ⁺ 濃度 (mg-N/L) |
| 通電型固定床メタン発酵槽 (BPR) | 55 | 7.5 | 9.6 | 20.1±2.6 | 75.2 | 72.9 | 1813 |
| 混合攪拌型メタン発酵槽 (STR) | 55 | 20 | 3.6 | 21.4±5.9 | 64.6 | 52.8 | 1804 |
| 実機 (年平均)* | 36 | 30 | 2.1 | 23.3 | 60.0 | 42.7 | 1060 |

* 文献 (李玉友ら、ECO INDUSTRY, 9(9):15-29, 2004) からの参考値

成果のまとめ

各研究項目に関する研究成果の概略と達成度を下記に記載する。

(1) デザイン化の素材となる有用微生物群の取得と特性・機能評価

模擬固形廃棄物を用いて固形廃棄物の分解に適した有用微生物群の取得とその維持に成功し、デザイン化担体の素材としての有用微生物群を取得した。

(2) 有用微生物群を用いた微生物群担体の効果

担体の特性が固定床メタン発酵に及ぼす影響を検討した結果、担体の種類によっては、担体上の高い微生物量と特定のメタン菌の増大が観察され、高負荷時のメタン生成維持に効果をもたらすことを明らかにした。本研究開発では、高負荷時の安定性に寄与するという観点から、繊維状の担体が適当であるという結果を得た。

(3) 微生物群の電気制御による安定化技術の開発

メタン発酵に対して通電の効果を検討するために、発酵槽に電極を設置して設定電位の制御を行った結果、高負荷条件においても安定したメタンガス生成、低級脂肪酸の蓄積が少ない等、発酵槽の能力として優れた性能を発揮できることを示した。発酵槽に設置した電極に対して適切な電位制御を行うことで、メタン発酵の処理能力向上に効果があることを明らかにし、高負荷条件での安定化技術の可能性を見いだした。

(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

デザイン化微生物群担体を通電によって電位制御しながらメタン発酵を行う通電型固定床メタン発酵槽の形状を検討し、その性能を定量的に評価した。その結果、発酵槽に電極を設置して電位制御した通電型メタン発酵槽よりも、さらに高い有機物負荷量において安定した処理が可能であることを見だし、一定の廃棄物を処理するための発酵槽をよりコンパクトにすることが可能となった。目標とした負荷量以上での安定したメタン発酵を実現しており、メタン発酵の効率化及び発酵槽のコンパ

ト化に関しては当初の目標を達成した。

(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

実廃棄物として濃縮下水汚泥を用いて通電型固定床メタン発酵槽の性能を評価したところ、汚泥提供元処理設備に比べて通電型固定床メタン発酵槽において高い有機物負荷量で処理が可能であることを示し、メタン発酵槽のコンパクト化に貢献できる技術を立証した。

以上より、メタン発酵のプロセスにおいて高い負荷量でもメタン発酵に有用な微生物群及び処理能力を安定的に維持できる技術を開発し、高負荷運転(短い滞留時間)でメタン発酵処理を可能とする基盤技術の確立に成功した。その結果、通電型固定床メタン発酵槽では、従来のメタン発酵槽に比べ 50%以上のコンパクト化を実現した。

年度毎の特許、論文、外部発表等（件数）

電力中央研究所

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

| 区分 年度 | 特許出願 | | | 論文 | | 学会発表等 （プレス発表等） |
|----------|------|----|---------------------|----------|-----|-------------------|
| | 国内 | 外国 | PCT [※] 出願 | 査読付 き | その他 | |
| H19FY | 0件 | 0件 | 0件 | 0件 | 0件 | 1件（0件） |
| H20FY | 1件 | 0件 | 0件 | 0件 | 0件 | 2件（0件） |
| H21FY | 2件 | 0件 | 0件 | 1件 | 0件 | 2件（1件） |
| H22FY | 2件 | 0件 | 0件 | 3件 | 0件 | 5件（2件） |
| H23FY | 0件 | 0件 | 0件 | 4件 | 1件 | 2件（0件） |

（※Patent Cooperation Treaty：特許協力条約）

IV. 実用化の見通しについて

1.1 (実用化の見通し 株式会社 日立プラントテクノロジー)

日立プラントテクノロジーではこれまで包括固定化担体を 7,000m³ 生産し、下水処理場や産業廃水処理場に納入し稼働している。硝化細菌を固定化した包括固定化担体で、古いものでは 18 年間稼働している。今回、内生呼吸低減菌を見出し、また亜硝酸型硝化の手法を見出した。これらの技術はこれまで納入し稼働している施設での活用が可能であり、曝気量を大幅に低減できる。22, 23 年度での実証試験を踏まえ、実用化できると判断する。

本技術は食品廃水、機械廃水、化学廃水、電子部品廃水、発酵廃水、下水、電力廃水など生物処理が可能なあらゆる廃水に利用でき、曝気エネルギー低減を達成できる見通しである。具体的には新設、既設に対応でき、特に既設設備については現在稼働している担体投入型循環変法の硝化槽に本開発担体を投入し、担体引き抜きアルカリ処理装置を備えれば曝気エネルギー低減を達成できる。(図1)

機能化技術[1]

包括固定化担体を用いたコンタミ防止維持システム開発

担体の表面をアルカリ処理しコンタミによるバイオフィルムの形成防止

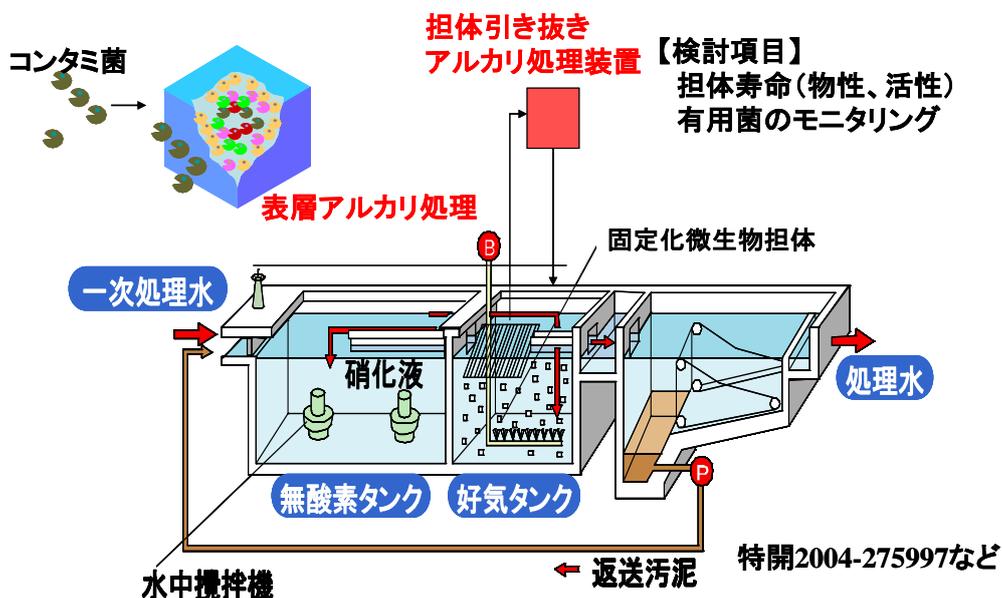


図1 包括固定化担体を用いた実用化概念図

2.1 (実用化の見通し 広島大学)

嫌気性処理水に溶存しているメタン放散に防止においては、溶存メタン・有機物・硫黄・アンモニアを含む模擬排水を用いた場合でも、密閉型 DHS リアクターにより、90%以上の溶存メタン除去率を HRT 2 時間で達成できることから、実排水においても同程度の除去性能が期待でき、溶存メタン放散防止は直ちに実用化できる見通しである。

DHS リアクターによる亜酸化窒素ガス分解については、酸化分解やメタンを用いた還元ともに継続的に除去されることは確認できたが、除去率 90%にはまだ至っていない。また、反応に関与する微生物群についても一部しか解明できていない。実用化に向けては、亜酸化窒素分解微生物の至適環境条件の調査が必要である。

密閉型 DHS リアクターによる下水からのリン除去・濃縮回収技術については、浄化センターに設置したパイロットプラントを用いて、実下水からのリン回収試験を行い、運転・操作方法を確立した。しかし、リン濃度を 10 倍以上に濃縮できることは実証できたが、実用化の目安となる $100 \text{ mg-P} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上のリン濃縮液の回収までには至っておらず、実用化に向けてはパイロットプラントの運転を継続して、これを実証する必要がある。

なお、本技術の基礎となっている好気性 DHS リアクターの性能は、インドや国内の下水処理場で既に実証・公表されていることから、DHS リアクターを用いることに関して何ら問題は生じないと考えられる。

2.2 (波及効果 広島大学)

従来 of 下水・排水処理技術に温室効果ガス処理・リン回収 DHS リアクターを組み合わせる事で、21 世紀型排水処理システムとして日本の技術を世界に向けて発信することができる。特に温室効果ガス排出削減は世界的な課題である事から、温室効果ガス処理 DHS リアクターを組み込んだ排水処理装置は世界的にも注目を浴びるものと期待できる。

3.1 (実用化の見通し 北海道大学地球環境科学研究所)

項目3について、以下の2つの可能性が考えられる。

ケース1：省エネルギー型高効率栄養塩除去システム

従来の嫌気好気の二槽式活性汚泥法では1立米あたりの電気などのエネルギー消費量は約800ワット時であるが、その後段処理の50%相当分を項目3で開発した植物-根圏細菌群デザイン化システム(新植生浄化ユニット)で置き換えた場合、同程度の水処理に要するエネルギーは300ワット時程度まで削減できると試算できる。さらに余剰植物体からのバイオエタノール生産で生成されるエネルギーはおよそ60ワット時と見積もる事ができ、これを併せると極めて経済性の高い水処理法が提供できるものと考えられる。ただし、その実現までには、新植生浄化ユニットの野外実証試験に加えて、植生浄化ユニットの構築および最適運転条件の策定あるいは既存排水処理施設の改造などが必要である。

ケース2：二次処理水の水質安定化

近年、ノニルフェノールやビスフェノールなどの内分泌攪乱物質やさまざまな難分解性化合物(POPs)が工場廃水に混入するリスクが増えている。すなわち、今後二次処理が必要な廃水は増えることが予想されその処理の必要性は高まるであろう。現在はオゾン処理などコストの嵩む方法が高度処理技術として用いられているが、項目3をさらに発展させてPOPsに対応できる新植生浄化ユニットが開発できれば、省エネ型の高度処理技術が提供できる可能性がある。

4.1 (実用化の見通し 北海道大学工学研究所)

研究開発項目毎の実用化の見通しは以下のとおりである。

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)添加を行うというアイデアはオリジナルであり、本研究でその有用性が確認されれば、運転操作も容易でありかつヒドロキシルアミンは比較的安価であることから実用化が十分可能である。また、本研究で用いたanammox細菌、*Ca. Brocadia sinica*は、②ヒドロキシルアミンを中間代謝物として生成、利用することが可能である。

Anammoxリアクターはすでに十分な窒素除去能力を達成しており実用化が見えている。今後、本

研究で得られたデータを基に、スケールアップを行い、実廃水（例えば、製鉄所廃水（安水）や嫌気性消化廃水など）に適用し実践的な検討を行うことにより、より安定的なリアクターを構築できる。

これまでの研究から得られた基礎的な情報は、論文発表などを通して、微生物応用利用分野および水処理工学分野で情報発信を積極的に行っている。英文論文は 5 報、和文論文は 1 報発表済み、英文論文 2 報投準備中である。また、国際学会において 7 編口頭およびポスター発表を行った。

4.2 波及効果（北海道大学地球環境科学研究所）

本事業の研究開発の成果から、以下のような波及効果が期待できる。

- (1) このプロセスの開発導入により、従来の活性汚泥法を用いた硝化―脱窒法と比較して、15 倍以上の窒素除去速度（30 Kg-TN/m³/day）が得られる。また、理論的には 50%以上のトータルランニングコストの削減、余剰汚泥の発生量を 70%以下に削減が可能であり、高効率・省エネルギー、低コスト型の窒素除去システムを構築可能となる。これは、持続型社会の構築に大きく貢献する。
- (2) 公共用水域の富栄養化問題は長年の課題となっており、特に閉鎖性水域へ排出される排水の窒素・リンについては、今後さらに規制はさらに強化される。このような現状にあって、新規に導入される高度廃水処理プロセスは、十分な処理性能だけでなく省資源・省エネルギー・低コスト性が要求される。このような社会的情勢は、提案する部分硝化―Anammox プロセスの実廃水処理への導入のインセンティブとなり、早期実用化を加速すると考える。
- (3) Anammox 関連の研究開発において、日本は欧州の後塵を拝する状況にあるが、欧州においても、未だ高効率・安定的な Anammox リアクターの構築・運転技術は確立していない。この段階で、日本が英知を結集させ技術開発を積極的に推進すれば、必ず、欧州の技術に勝る「Anammox プロセス」が開発され、水処理（窒素除去）の市場を獲得できると確信している。

5.1 （実用化の見通し 電力中央研究所）

NEDOの基本計画では、生ごみ等を主な対象として稼動している現行のメタン発酵処理施設における日平均容積効率を 8.5gCOD/L/日と想定し、その 3 倍の効率を達成することで、メタン発酵槽の約 50%コンパクト化を実現することを目標とした。本研究開発では、微生物群を保持した担体と担体への通電による微生物制御技術を組み合わせたメタン発酵槽により、数 L レ

ベルの実験室規模ではあるが、メタン発酵の高負荷運転での安定処理を確認し、模擬生ごみで目標以上の効率化を実証した。また、実廃棄物である下水汚泥を対象にしても効率向上および発酵槽のコンパクト化が可能なことを明らかとし、当初対象の食品廃棄物以外においても本技術の有効性を示しており、その実用が期待される。本技術の実用化を図るには、まずは5年程度で段階的なスケールアップの検討を行い、その規模における担体等の構造や耐久性等の実証やコストおよびエネルギー収支の評価が必要である。装置の規模の増加にあたっては、エンジニアリングの要素が大きくなるため、プラントメーカーとの連携が必須であり、プラントメーカーとの共同開発について検討していく。

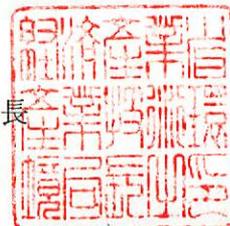
5.2 (波及効果 電力中央研究所)

本研究開発では、メタン発酵において発酵槽内の微生物群濃度と微生物活性を維持し、処理プロセスの効率化を図るために、担体と担体への通電による制御を組み合わせた微生物群の制御技術に関して検討を行った。スケールアップなどの検討によって実規模での実証が行われ、本技術の有効性が示された場合には、エネルギー回収の観点からは有利ではあるものの施設の設置場所や初期コストなどから採用されなかったメタン発酵処理の適用拡大が期待される。また、微生物群を制御する技術は、反応系に適した電位調整などの制御が可能であることから、メタン発酵に限ることではなく、微生物群としての機能を利用するバイオプロセスに共通の技術となり得るため、応用的汎用性があると考えられる。また、本技術はメタン発酵のような微生物群の反応系以外に純粋培養系にも適用が可能と考えられ、広い範囲の発酵系の応用も期待される。従って、本事業において本技術の有用性を実証した知見は、メタン発酵のみならず将来的にはバイオエタノール生産、発酵生産、医薬品生産など様々なバイオプロセスへ適用できると考える。

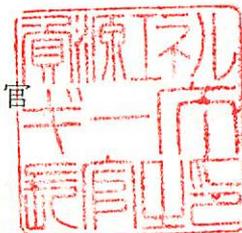
経済産業省

平成20・03・25産局第5号
平成20年4月1日

経済産業省産業技術環境局長



経済産業省資源エネルギー庁長官



エネルギーイノベーションプログラム基本計画の制定について

上記の件について、イノベーションプログラム実施要領（平成16・07・27産局第1号）第4条第1項の規定に基づき、別添のとおり制定する。

エネルギーイノベーションプログラム基本計画

1. 目的

資源に乏しい我が国が、将来にわたり持続的発展を達成するためには、革新的なエネルギー技術の開発、導入・普及によって、各国に先んじて次世代型のエネルギー利用社会の構築に取り組んでいくことが不可欠である。他方、エネルギー技術開発は、長期間を要するとともに大規模投資を伴う一方で将来の不確実性が大きいことから、民間企業が持続的な取組を行うことは必ずしも容易ではない。このため、政府が長期を見据えた将来の技術進展の方向性を示し、官民双方がこの方向性を共有することで、将来の不確実性に対する懸念が緩和され、官民において長期にわたり軸のぶれない取組の実施が可能となる。以下に 5 つの政策の柱毎に目的を示す。

1 - . 総合エネルギー効率の向上

1970年代以来、官民をあげて省エネルギーに取り組み、産業構造の転換や新たな製造技術の導入、民生機器の効率改善等により世界最高水準の省エネルギーを達成している。今後、「新・国家エネルギー戦略」に掲げる、2030年までにGDPあたりのエネルギー利用効率を約30%向上を実現していくためには、産業部門はもとより、全部門において、総合エネルギー効率の向上に資する技術開発とその成果の導入を促進する。

1 - . 運輸部門の燃料多様化

ほぼ100%を石油に依存する運輸部門は、我が国エネルギー需給構造上、最も脆弱性が高く、その需給構造の次世代化は、将来に向けた早急な対策が不可欠な課題となっている。

「新・国家エネルギー戦略」に掲げる目標（2030年に向け、運輸部門の石油依存度が80%程度となることを目指す）の実現のためにも、官民が中長期的な展望・方向性を共有しつつ、技術開発と関連施策を推進する。

1 - . 新エネルギー等の開発・導入促進

太陽光、風力、バイオマスなどの新エネルギーは、エネルギー源の多様化や地球温暖化対策の観点から重要である。しかし、現時点では経済性や出力安定性といった普及へ向けての課題が存在する。

そのため、これらの課題解決に向けた技術開発の推進及び新エネルギーの導入促進のための関連施策の実施により、更なる新エネルギーの普及を推進する。

1 - . 原子力等利用の推進とその大前提となる安全の確保

原子力発電は供給安定性に優れ、運用時にCO₂を排出しないクリーンなエネルギー源である。安全確保を大前提に核燃料サイクルを含む原子力発電を着実に推進する。

1 - . 化石燃料の安定供給確保と有効かつクリーンな利用

化石燃料資源の大宗を輸入に依存する我が国にとって、その安定供給の確保は国家安全保障に直結する課題である。このため、石油・天然ガス等の安定供給確保を目指し、我が国企業による資源国における資源開発等に対する支援等の施策を進めるとともに、その有効かつクリーンな利用を図る。

(8) 微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発

i) 微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発 (運営費交付金)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、省エネルギーかつ環境負荷が少ないといった特徴を有する微生物機能を活用した有用物質の革新的な生産プロセス (モノ作り) の技術を構築するため、産業用途に必要な機能既知遺伝子で構成されたゲノムを持ち、物質生産性向上につながる性能を備えた高性能宿主細胞の創製や、微生物反応の多様化・高機能化技術を開発するとともに、バイオマスを原料として有用物質を体系的かつ効率的に生産する (バイオリファイナリー) ための基盤技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、物質生産性向上につながる性能を備えた高性能宿主細胞を創製するとともに、バイオプロセスの実用化適用範囲の拡大のための微生物反応の多様化・高機能化技術の開発を行う。バイオリファイナリー技術については、バイオマスを高効率で糖化し、糖から高効率で各種化成品の基幹物質を生産するバイオプロセス体系を構築する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

ii) 微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発 (運営費交付金)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、従来エネルギー多消費・廃棄物多排出型であった廃水・廃棄物処理において、微生物群の構成及び配置等を人為的に制御 (デザイン化) することで、その処理効率を大幅に向上させ、省エネルギーで廃棄物も少ない高効率型廃水、廃棄物処理の基盤技術を確立する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、特定有用微生物群を人為的に安定導入・維持もしくは人為的に空間配置・優先化させる等のデザイン化技術を開発し、従来の廃水、廃棄物処理に比べより高効率で省エネルギーな処理技術を開発するとともに、実用化に資するための実証可能なテストプラント規模にて評価する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(9) 省エネルギー型化学技術創成研究開発補助事業

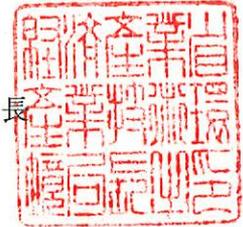
概要

化学産業はそれ自身が裾野の広い産業というだけでなく、自動車、IT機器等の川下製品の部材として産業界・国民生活の様々な分野に深く関連している。従って化学業界において、省エネポテンシャルの大きい有望な技術シーズがありながら民間だけでは十分な研究開発投資が行われていない技術について、戦略的な研究開発支援を実施することにより、化学産業のみならず、各種最終製品、他産業においてエネルギー効率の改善を促進する。

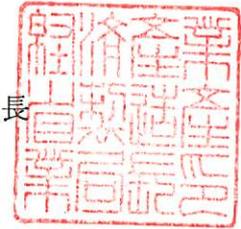
経済産業省

平成20・03・25産局第7号
平成20年4月1日

経済産業省産業技術環境局長



経済産業省製造産業局長



環境安心イノベーションプログラム基本計画の制定について

上記の件について、イノベーションプログラム実施要領（平成16・07・27産局第1号）第4条第1項の規定に基づき、別添のとおり制定する。

環境安心イノベーションプログラム基本計画

1. 目的

資源制約を克服し、環境と調和した持続的な経済・社会の実現と、安全・安心な国民生活を実現するため、革新的な技術の開発等を通じた地球全体での温室効果ガスの排出削減、廃棄物の発生抑制（リデュース）、製品や部品の再使用（リユース）、原材料としての再利用（リサイクル）推進による循環型社会の形成、バイオテクノロジーを活用した環境に優しい製造プロセスや循環型産業システムの創造、化学物質のリスクの総合的な評価及びリスクを適切に管理する社会システムの構築を推進する。

2. 政策的位置付け

第3期科学技術基本計画（2006年3月閣議決定）及び分野別推進戦略（2006年3月総合科学技術会議）における国家的・社会的課題に対応した研究開発の重点推進分野である環境分野及び国の存立にとって基盤的であり国として取り組むことが不可欠な研究開発の推進分野であるエネルギー分野に位置付けられるものであるほか、次のとおりである。

「地球温暖化対策技術研究開発の推進について」（2003年4月総合科学技術会議）

総合科学技術会議重点分野推進戦略専門委員会に設置された温暖化対策技術プロジェクトチームでまとめられた上記報告書における研究開発推進戦略に対応するものである。

Cool Earth - エネルギー革新技术計画（2008年3月経産省公表）

重点的に取り組むべきエネルギー革新技术「21」を含むものである。

京都議定書目標達成計画（2005年4月閣議決定）

目標達成のための対策と施策のうち地球温暖化対策技術開発の推進に位置づけられるものである。

イノベーション25（2007年6月閣議決定）

イノベーション立国に向けた政策ロードマップ - 技術革新戦略ロードマップ「世界的課題解決に貢献する社会 ものづくり技術分野」の中で「3R型設計・生産・メンテナンス技術、製品の設計・製造段階でのリサイクル阻害物質の使用排除を可能とする技術、製品中の有用・有害物質管理技術の開発・標準化」が資源を有効利用し、環境に配慮したものづくり技術として位置づけられている。

21世紀環境立国戦略（2007年6月閣議決定）

今後1、2年で重点的に着手すべき八つの戦略の中で「3R関連法制度等の充実や技術開発の支援を通じて、製品のライフサイクル全体での天然資源投入量の最小化や再生資源の高付加価値製品への利用を促進し、資源生産性の更なる向上と環境負荷の低減を図る」との方針が示されている。

経済成長戦略大綱（2006年7月財政・経済一体改革会議）

「環境と経済の両立を図るため、金融面からの環境配慮を進めるとともに、環境技

(2) 微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発(再掲)

() 微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発(運営費交付金)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、省エネルギーかつ環境負荷が少ないといった特徴を有する微生物機能を活用した有用物質の革新的な生産プロセス(モノ作り)の技術を構築するため、産業用途に必要な機能既知遺伝子で構成されたゲノムを持ち、物質生産性向上につながる性能を備えた高性能宿主細胞の創製や、微生物反応の多様化・高機能化技術を開発するとともに、バイオマスを原料として有用物質を体系的かつ効率的に生産する(バイオリファイナリー)ための基盤技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、物質生産性向上につながる性能を備えた高性能宿主細胞を創製するとともに、バイオプロセスの実用化適用範囲の拡大のための微生物反応の多様化・高機能化技術の開発を行う。バイオリファイナリー技術については、バイオマスを高効率で糖化し、糖から高効率で各種化成品の基幹物質を生産するバイオプロセス体系を構築する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(ii) 微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発(運営費交付金)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、従来エネルギー多消費・廃棄物多排出型であった廃水・廃棄物処理において、微生物群の構成及び配置等を人為的に制御(デザイン化)することで、その処理効率を大幅に向上させ、省エネルギーで廃棄物も少ない高効率型廃水、廃棄物処理の基盤技術を確立する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、特定有用微生物群を人為的に安定導入・維持もしくは人為的に空間配置・優先化させる等のデザイン化技術を開発し、従来の廃水、廃棄物処理に比べより高効率で省エネルギーな処理技術を開発するとともに、実用化に資するための実証可能なテストプラント規模にて評価する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(3) バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発(再掲)

概要

バイオマスに関する燃料分野と化成品分野の融合・連携を図り、食料と競合しないセルロース系原料から、より低コストで高効率なエネルギー化を可能にする先進的・革新的な新技術の確立を目指すとともに、バイオ燃料の製造のみならず、プロパノール、ブタノール製造、化学品の製造の実用化を目指した技術開発を行う。

技術目標及び達成時期

2012年度までに、セルロース系バイオマスを原料とし、バイオ燃料製造の従来技術に比べて画期的に優れた効率や低コスト化を可能とする糖化・発酵等の基盤

年度毎の特許、論文、外部発表等

株式会社 日立プラントテクノロジー

(1) 研究論文 1件 講演 8件

| 番号 | 発表者 | 所属(筆頭者) | タイトル | 発表誌名, ページ番号 | 査読 | 発表年 |
|----|--|-----------------|--|---|----|-------|
| 1 | 生田 創 角野 立夫 | (株)日立プラントテクノロジー | 廃水処理の曝気量低減に向けた基礎的検討 | 第43回日本水環境学会 年会講演集,2009,69 | — | 2009年 |
| 2 | 生田 創 角野 立夫 原山 重明 諏訪 裕一 | (株)日立プラントテクノロジー | Reducing Aeration requirement for Biological Wastewater Treatment | The 3rd IWA-ASPIRE Conference & Exhibition 2009(Taipei),150 | — | 2009年 |
| 3 | 生田 創 角野 立夫 原山 重明 諏訪 裕一 | (株)日立プラントテクノロジー | pH ショック法を用いた亜 硝酸型硝化技術の検討 | 日本水処理生物学会 第46回大会(高知大会) 日本水処理生物学会誌 別巻第29号,2009,56 | — | 2009年 |
| 4 | KEYA Chaman Ara 諏訪裕一 原山重明 生田 創 角野立夫 | 中央大学 | 活性汚泥構成菌の内生 呼吸 | 日本水処理生物学会 第46回大会(高知大会) 日本水処理生物学会誌 別巻第29号,2009,63 | — | 2009年 |
| 5 | 生田 創 角野立夫 原山 重明 諏訪 裕一ら | (株)日立プラントテクノロジー | pH ショック法による亜硝 酸型硝化システムの評価 | 第44回日本水環境学会 年会講演集,2010,503 | — | 2010年 |
| 6 | 原山 重明 諏訪 裕一ら | 中央大学 | A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. | Journal of Microbiological Methods (2011) 84; 46-51. | 有 | 2011年 |
| 7 | 生田 創 諏訪 裕一 勝山 知恵 原山 重明ら | (株)日立プラントテクノロジー | 亜硝酸酸化活性に及ぼ す遊離アンモニアの影響 評価 | 第45回日本水環境学会 年会講演集,2011,36 | — | 2011年 |
| 8 | 勝山 知恵 諏訪 裕一 原山 重明 生田 創ら | 中央大学 | 亜硝酸型硝化プロセスに おける亜酸化窒素発生抑 制条件の検討 | 第45回日本水環境学会 年会講演集,2012,37 | — | 2011年 |
| 9 | 勝山 知恵 諏訪 裕一 原山 重明 生田 創ら | 中央大学 | 亜硝酸型硝化処理にお ける亜酸化窒素発生の 評価 | 第46回日本水環境学会 年会講演集,2012,42 | — | 2012年 |

(2) 特許等 なし

(3) 受賞実績 なし

年度毎の特許、論文、外部発表等リスト

広島大学

【特許】

| 番号 | 出願者 | 出願番号 | 国内 外国 PCT | 出願日 | 状態 | 名 称 | 発明者 |
|----|------|------------------|-----------------|------------|----|---------------|--------|
| 1 | 広島大学 | 特願 2009-44797 | 国内 | 2009/02/26 | 公開 | リンの回収方法及び回収装置 | 大橋晶良 他 |

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

【論文】

| 番号 | 発表者 | 所属 | タイトル | 発表誌名、ページ番号 | 査読 | 発表年 |
|----|--------------------|------|---|--|----|------|
| 1 | 小寺博也 他 | 広島大学 | 密閉型 DHS リアクターによるリン含有水の高濃度化回収 | 第 46 回環境工学研究フォーラム環境工学研究論文集 | 有 | 2008 |
| 2 | 幡本将史 他 | 広島大学 | DHS リアクターによる溶存メタンの生物学的酸化分解処理 | 第 46 回環境工学研究フォーラム環境工学研究論文集 | 有 | 2008 |
| 3 | M. Hatamoto et al. | 広島大学 | Biological oxidation of dissolved methane in effluents from anaerobic reactors using a down-flow hanging sponge reactor | Water Research, Vol.44, pp.1409-1418 | 有 | 2010 |
| 4 | M. Hatamoto et al. | 広島大学 | Dissolved methane oxidation and competition for oxygen in down-flow hanging sponge reactor for post-treatment of anaerobic wastewater treatment | Bioresource Technology, Vol.102 pp.10299-10304 | 有 | 2011 |

【著書】

| 番号 | 執筆者 | 所属 | タイトル | 書籍名 | 発表年 |
|----|------------------|------|-------------------------|---------------------------|------|
| 1 | 大橋晶良 他 (分担執筆) | 広島大学 | 「DHS リアクターシステムを用いたリン回収」 | リン資源の回収と有効利用、サイエンス&テクノロジー | 2009 |

【外部発表】

| 番号 | 発表者 | 所属 | タイトル | 発表学会 | 発表年 |
|----|--------------------|------|--|--|------|
| 1 | 小寺博也 他 | 広島大学 | 生物学的リン回収に及ぼす嫌気・好気サイクルの影響 | 第60回土木学会中国支部研究発表会 | 2008 |
| 2 | 阿部憲一 他 | 広島大学 | 微生物による亜酸化窒素 (N ₂ O) 酸化分解能の調査 | 第60回土木学会中国支部研究発表会 | 2008 |
| 3 | 小寺博也 他 | 広島大学 | 生物学的リン回収における嫌気・好気時間の影響 | 土木学会 年次学術講演会 | 2008 |
| 4 | H. Kodera et al. | 広島大学 | EFFECT OF ANAEROBIC/AEROBIC INTERVAL ON ENHANCED BIOLOGICAL PHOSPHORUS REMOVAL USING TUBULAR BIOFILM REACTOR | International Conference on Civil and Environmental Engineering (ICCEE-2008) | 2008 |
| 5 | 阿部憲一 他 | 広島大学 | 窒素除去プロセスにおける亜酸化窒素の発生 | 第43回水環境学会年会 | 2009 |
| 6 | ツォン ホエイ ピン 他 | 広島大学 | Investigation of Nitrous Oxide Degradation by Biological Oxidation | 第43回水環境学会年会 | 2009 |
| 7 | 山本崇寛 他 | 広島大学 | 嫌気メタン酸化と脱窒の共役を利用した温室効果ガスの生物学的除去プロセスの開発 | 第43回水環境学会年会 | 2009 |
| 8 | 幡本将史 他 | 広島大学 | 溶存メタン処理リアクターにおいてメタンの分解に関与する微生物群集 | 第43回水環境学会年会 | 2009 |
| 9 | 幡本将史 他 | 広島大学 | DHS リアクターを用いた溶存メタンの生物学的酸化分解処理 | 第43回水環境学会年会 | 2009 |
| 10 | 小寺博也 他 | 広島大学 | DHS リアクターを用いた新しいリン回収技術 | 第43回水環境学会年会 | 2009 |
| 11 | H. Kodera et al. | 広島大学 | Investigation of the optimum time for EBPR with tubular reactor | International Symposium on Green Technology for Global Carbon Cycle in Asia | 2009 |
| 12 | M. Hatamoto et al. | 広島大学 | Biological dissolved methane treatment using closed DHS reactor | International Symposium on Green Technology for Global Carbon Cycle in Asia | 2009 |
| 13 | M. Hatamoto et al. | 広島大学 | Methane oxidizing bacteria in closed DHS reactor treating dissolved methane in anaerobic wastewater treatment effluent | Specialised Conference on Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment | 2009 |
| 14 | 小寺博也 他 | 広島大学 | 生物膜型リアクターによる下水からのリン回収 | 第64回土木学会年次学術講演会 | 2009 |
| 15 | 小寺博也 他 | 広島大学 | ポリリン酸蓄積細菌が優占的に増殖する嫌気・好気時間 | 第12回日本水環境学会シンポジウム | 2009 |
| 16 | H. Kodera et al. | 広島大学 | Recovery of High-Concentrated Phosphorus Solution Using a DHS Reactor | International Conference on Civil and Environmental Engineering (ICCEE-2009) | 2009 |
| 17 | 山本崇寛 他 | 広島大学 | 温室効果ガス・メタンと亜酸化窒素の嫌気的生物学的同時処理 | 第44回水環境学会年会 | 2010 |
| 18 | 宮内智 他 | 広島大学 | 溶存メタン含有嫌気性処理水の生物学的後段処理 | 第44回水環境学会年会 | 2010 |
| 19 | 小寺博也 他 | 広島大学 | リン除去性能に及ぼす多様なポリリン酸蓄積細菌の存在 | 第44回水環境学会年会 | 2010 |
| 20 | 小寺博也 他 | 広島大学 | 嫌気・好気 DHS リアクターを用いた廃水処理水からのリン回収 | 第62回土木学会中国支部研究発表会 | 2010 |
| 21 | H. Kodera et al. | 広島大学 | Recovery of Phosphorus as Highly Concentrated Solution Using an Anaerobic-Oxic DHS Reactor | Water and Environment Technology Conference International Forum for Scientists and Engineers | 2010 |
| 22 | H. Kodera et al. | 広島大学 | Effects of anaerobic-aerobic period on the microbial community structure of polyphosphate accumulating organisms | 13th International Symposium on Microbial Ecology [ISME-13] | 2010 |
| 23 | 小寺博也 他 | 広島大学 | 生物膜型リアクターを用いたリン回収と微生物群集構造の解析 | 第65回土木学会全国大会年次学術講演会 | 2010 |
| 24 | 山本崇寛 他 | 広島大学 | メタンを炭素源とした亜酸化窒素の脱窒 | 第47回環境工学研究フォーラム | 2010 |
| 25 | 幡本将史 他 | 広島大学 | 嫌気性処理水の生物学的後段処理における溶存メタンの酸化分解 | 第47回環境工学研究フォーラム | 2010 |
| 26 | 小寺博也 他 | 広島大学 | 生物膜型リアクターを用いたリン濃縮液回収技術 | 第45回日本水環境学会年会 | 2011 |
| 27 | 間口暢之 他 | 広島 | 高濃度塩分・嫌気/好気環境下に生息するポリリン | 第45回日本水環境学会年会 | 2011 |

| | | | | | |
|----|------------------|------|---|--|------|
| | | 大学 | 酸蓄積細菌の探索 | | |
| 28 | 山本崇寛 他 | 広島大学 | DHS リアクターを用いたメタン・亜酸化窒素の同時処理 | 第 45 回日本水環境学会年会 | 2011 |
| 29 | H. Kodera et al. | 広島大学 | Phosphorus recovery as condensed liquid using an anaerobic-oxic DHS reactor | International Conference on Civil and Environmental Engineering [ICCEE] 2010 | 2011 |
| 30 | 間口暢之 他 | 広島大学 | 高濃度塩分環境下に生息するポリリン酸蓄積細菌の集積培養 | 第 63 回土木学会中国支部大会 | 2011 |
| 31 | 間口暢之 他 | 広島大学 | 高濃度塩分環境下に生息するポリリン酸蓄積細菌 | 第 27 回日本微生物生態学会大会 | 2011 |
| 32 | 間口暢之 他 | 広島大学 | DHS リアクターを用いた海洋性ポリリン酸蓄積細菌の集積培養 | 第 46 回日本水環境学会年会 | 2012 |
| 33 | 竹縄温 他 | 広島大学 | UASB-好気 DHS-リン回収 DHS による高濃度硫酸イオン含有実下水処理 | 第 46 回日本水環境学会年会 | 2012 |
| 34 | 小寺博也 他 | 広島大学 | ポリリン酸蓄積細菌の多様性 | 第 46 回日本水環境学会年会 | 2012 |

年度毎の特許、論文、外部発表等リスト

北海道大学地球環境科学研究所

平成 19 年度

【特許】なし

【論文】3件

| 番号 | 発表者 | 所属 | タイトル | 発表誌名、ページ番号 | 査読 | 発表年 |
|----|---|-------------------|--|---|----|------|
| 1 | Ito H, Hosokawa R, Morikawa M, Okuyama H. | 北海道大学大学院地球環境科学研究所 | A turbine oil-degrading bacterial consortium from soils of oil fields and its characteristics. | <i>Int Biodeter Biodegr</i> , 61 , 223-232 | 有 | 2007 |
| 2 | 森川正章 | 北海道大学大学院地球環境科学研究所 | バイオレメディエーション | 北海道大学大学院環境科学院編「環境修復の科学と技術」第4章3節 pp150-186 | 無 | 2007 |
| 3 | 森川正章 | 北海道大学大学院地球環境科学研究所 | バイオフィルム | 山根恒夫編「ナノバイオ大事典」pp 420-423 | 無 | 2007 |

【外部発表】5件

| 番号 | 発表者 | 学会名等 | 発表タイトル | 発表場所 | 発表年月日 |
|----|---|-------------------|--|-------|-----------------|
| 1 | 森川正章, 相原 悠, 山崎和彦, 鷺尾健司 | 生化学会北海道支部シンポジウム | 環境微生物の生存戦略ーバイオフィルムー | 北海道大学 | 2007. 7. 6. |
| 2 | 大木海平, 松井大悟, 平田善彦, 鷺尾健司, 森川正章 | 日本農芸化学会 2008 年度大会 | 小便器内壁から単離した細菌のバイオフィルム形成能 | 名城大学 | 2008. 3. 27-29. |
| 3 | 嶋田恒平, 片岡剛文, 鷺尾健司, 森川正章 | 日本農芸化学会 2008 年度大会 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> バイオフィルムのナフタレン分解活性と土壌安定性 | 名城大学 | 2008. 3. 27-29. |
| 4 | 東條ふゆみ, 佐藤 禅, 鷺尾健司, 森川正章 | 日本農芸化学会 2008 年度大会 | 食中毒原因細菌のバイオフィルムと浮遊細胞の加熱処理耐性比較 | 名城大学 | 2008. 3. 27-29. |
| 5 | 阿形朋子, 松見理恵, 鷺尾健司, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 森川正章 | 日本農芸化学会 2008 年度大会 | 超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 の浮遊細胞とコロニー細胞を用いたプロテオーム解析 | 名城大学 | 2008. 3. 27-29. |

平成 20 年度

【特許】1件

| 番号 | 出願者 | 出願番号 | 国内外国 PCT | 出願日 | 状態 | 名称 | 発明者 |
|----|--------------|------------------|----------|----------------|----|-----------|------------------|
| 1 | 国立大学法人 北海道大学 | 特願 2008-099213 号 | 国内 | 2008 年 4 月 7 日 | 公開 | 新規水草根圏微生物 | 森川正章, 鷺尾健司, 山賀文子 |

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

【論文】8件

| 番号 | 発表者 | 所属 | タイトル | 発表誌名、ページ番号 | 査読 | 発表年 |
|----|--------------------------------|-------------------|---|--|----|------|
| 1 | Takei D, Washio K, Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境科学研究所 | Identification of alkane hydroxylase genes in <i>Rhodococcus</i> sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane. | <i>Biotechnol Lett</i> , 30 , 1447-1452 | 有 | 2008 |

| | | | | | | |
|---|---|---------------------------|--|--|---|------|
| 2 | Thaniyavarn J, Chianguthai T, Sangvanich P, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M, Thaniyavarn S. | 北海道大学 大学院地球環境 科学研究院 | Production of sophorolipid biosurfactant by <i>Pichia anomala</i> . | <i>Biosci Biotechnol Biochem</i> , 72 , 2061-2068 | 有 | 2008 |
| 3 | Kato T, Miyanaga A, Kanaya S, Morikawa M. | 北海道大学 大学院地球環境 科学研究院 | Alkane inducible proteins in <i>Geobacillus thermoleovorans</i> B23. | <i>BMC Microbiology</i> , 9 , 60 | 有 | 2009 |
| 4 | Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. | 北海道大学 大学院地球環境 科学研究院 | Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38. | <i>J Appl Microbiol</i> , in press | 有 | 2009 |
| 5 | Iijima S, Washio K, Okahara R, Morikawa M. | 北海道大学 大学院地球環境 科学研究院 | Biofilm formation and proteolytic activities of <i>Pseudoalteromonas</i> bacteria that were isolated from fish farm sediments. | <i>Microbial Biotechnol</i> , in press | 有 | 2009 |
| 6 | 山賀文子, 鷲尾健司, 森川正章 | 北海道大学 大学院地球環境 科学研究院 | 持続的環境浄化技術を拓くウキクサと根圏微生物の共生系 | 化学と生物, 46 , 682-688 | 無 | 2008 |
| 7 | 森川正章 | 北海道大学 大学院地球環境 科学研究院 | 将来展望 バイオフィームがもたらすブレイクスルーの可能性 | ブッカーズ編「バイオフィームの基礎と制御」 pp 389-399 | 無 | 2008 |
| 8 | 鷲尾健司, 森川正章 | 北海道大学 大学院地球環境 科学研究院 | バイオサーファクタントを利用したバイオフィームの形成と阻害 | ブッカーズ編「バイオフィームの基礎と制御」 pp 278-287 | 無 | 2008 |

【外部発表】 15件

| 番号 | 発表者 | 学会名等 | 発表タイトル | 発表場所 | 発表年月日 |
|----|-------------------------------------|---|--|-------------------|------------------|
| 1 | Volta R. T. Gurning, 鷲尾健司, 森川正章 | 環境バイオテクノロジー学会 H20 年度大会 | 新規アゾ染料分解脱色細菌の探索 | つくば市文部科学省研究交流センター | 2008. 6. 25-26. |
| 2 | 森川正章 | 日本微生物生態学会 20 年度大会 | バイオフィームを利用した持続的環境浄化技術の基盤開発 | 北海道大学 (招待講演) | 2008. 11. 26-27. |
| 3 | 大木海平, 松井大悟, 平田善彦, 鷲尾健司, 森川正章 | 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 (BMB2008) | <i>Staphylococcus</i> 属細菌のバイオフィーム形成における尿素分解酵素 (ウレアーゼ) の役割 | 神戸国際会議場 | 2008. 12. 9-12. |
| 4 | 鷲尾健司, リムシューピン, ルーンサワンニラン, 森川正章 | 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 (BMB2008) | 環状リポペプチド、アルスロファクチンの産生を制御する (p)ppGpp 合成代謝酵素、SpoT の機能解析 | 神戸国際会議場 | 2008. 12. 9-12. |
| 5 | 東條ふゆみ, 伊東義兼, 鷲尾健司, 岡部聡, 森川正章 | 日本農芸化学会 2009 年度大会 | Anammox 細菌のグラニューール形成に関するプロテオミク解析 | 福岡国際会議場 | 2009. 3. 27-29. |
| 6 | 山崎和彦, 相原悠, 大胡康, 鷲尾健司, 森川正章 | 日本農芸化学会 2009 年度大会 | 枯草菌バイオフィームによるメナキノン菌体外生産 | 福岡国際会議場 | 2009. 3. 27-29. |
| 7 | 羽山亨, 山賀文子, 鷲尾健司, 森川正章 | 日本農芸化学会 2009 年度大会 | 根圏細菌 <i>Acinetobacter</i> sp. P23 株のバイオフィーム形成遺伝子の探索 | 福岡国際会議場 | 2009. 3. 27-29. |
| 8 | 高橋康徳, 嶋田恒平, 鷲尾健司, 森川正章 | 日本農芸化学会 2009 年度大会 | バイオフィーム形成能の高いアルカン分解細菌の探索 | 福岡国際会議場 | 2009. 3. 27-29. |
| 9 | 森川正章 | 日本農芸化学会 2009 年度大会 | バイオフィームの利用と将来展望 (シンポジウム企画と講演) | 福岡国際会議場 | 2009. 3. 27-29. |
| 10 | M.Morikawa, K.Shimada, K. Washio. | iBIO2008 | Efficacy of biofilm formation by naphthalene degrading <i>Pseudomonas stutzeri</i> T102 toward bioremediation technology. | 中国杭州 (招待講演) | 2008. 5. 19. |
| 11 | H. Aibara, K. Washio, M. Morikawa. | ASM108th | Biofilm formation by <i>Bacillus subtilis</i> 168, incompatible function of sfp. | 米国ボストン | 2008. 6. 1-5. |
| 12 | K. Shimada, K. Washio, M. Morikawa. | ASM108th | Efficacy of biofilm formation by naphthalene degrading <i>Pseudomonas stutzeri</i> T102 toward bioremediation technology. | 米国ボストン | 2008. 6. 1-5. |
| 13 | M. Morikawa | East China University of Science and Technology Seminar | A lipopeptide biosurfactant produced by <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38, characterization and functional analyses of the synthetase gene. | 中国上海 (招待講演) | 2008. 5. 20 |

添付資料

| | | | | | |
|----|-------------|-------------------------------------|---|---------------|------------|
| 14 | M. Morikawa | ARO (Army Research Office) workshop | Advances in Biofilm Research to Inhibit Biocorrosion. | 米国テキサス (招待講演) | 2008. 9 22 |
| 15 | 森川正章 | プレス発表 | 細菌使い土壌浄化 | 日本経済新聞 地方経済面 | 2008. 7.29 |

平成 21 年度

【特許】なし

【論文】5 件

| 番号 | 発表者 | 所属 | タイトル | 発表誌名、ページ番号 | 査読 | 発表年 |
|----|--|-------------------|---|---|----|------|
| 1 | Hosokawa R, Nagai M, Morikawa M, Okuyama H. | 北海道大学大学院地球環境科学研究科 | Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. | <i>World J Microbiol Biotechnol</i> , 25 , 1519-1528 | 有 | 2009 |
| 2 | Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境科学研究科 | Development of bioremediation by utilizing biofilms. | <i>IJO Res Commun</i> , 23 , 99-115 | 有 | 2009 |
| 3 | Kato T, Miyanaga A, Kanaya S, Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境科学研究科 | Gene cloning and characterization of an aldehyde dehydrogenase from long-chain alkane degrading <i>Geobacillus thermoleovorans</i> B23. | <i>Extremophiles</i> , 14 , 33-39 | 有 | 2010 |
| 4 | Oki K, Washio K, Matsui D, Kato S, Hirata Y, Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境科学研究科 | The Role of Urease Activity on Biofilm Formation by <i>Staphylococcus</i> sp. T-02 Isolated from the Toilet Bowl. | <i>Biosci Biotechnol Biochem</i> , 74 , 583-589 | 有 | 2010 |
| 5 | 森川正章 | 北海道大学大学院地球環境科学研究科 | バイオフィルム—微生物の生存戦略を生かす | 福井作蔵・秦野琢之編「微生物増殖学の現在・未来」pp 444-454 | 無 | 2009 |

【外部発表】13 件

| 番号 | 発表者 | 学会名等 | 発表タイトル | 発表場所 | 発表年月日 |
|----|------------------------------|--------------------------------|---|----------------------|------------------|
| 1 | 森川正章 | 日本化粧品技術者会 | 微生物から見た界面の世界・バイオサーファクタントとバイオフィルム | 薬業年金会館 (招待講演) | 2009. 4. 17. |
| 2 | 菅田曜、岩崎一弘、大川恵、森川正章、宮崎英男、坂間至朗 | 環境バイオテクノロジー学会 H21 年度大会 | 微生物によるジクロロメタン分解に関する研究 | 東京大学弥生講堂 | 2009. 6. 23. |
| 3 | 嶋田恒平、鷺尾健司、森川正章 | 環境バイオテクノロジー学会 H21 年度大会 | バイオフィルムに見られるナフトレン分解活性遅延の理由 | 東京大学弥生講堂 | 2009. 6. 23. |
| 4 | 阿形朋子、鷺尾健司、金井保、跡見晴幸、今中忠行、森川正章 | 第 82 回日本生化学会大会 | 超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 由来細胞表在タンパク質 Slp の機能解析 | 神戸ポートアイランド | 2009. 10. 22-24. |
| 5 | 石川絵理奈、伊東義兼、鷺尾健司、松本光史、森川正章 | 第 82 回日本生化学会大会 | 火力発電所硝化槽より単離した新規メタノール産生細菌の諸特性解析 | 神戸ポートアイランド | 2009. 10. 22-24. |
| 6 | 森川正章 | 日本水処理生物学会第 46 回大会 | ウキクサと根圏細胞の相利共生作用による汚染浄化法 | 高知市文化プラザかるぼーと (招待講演) | 2009. 11. 12. |
| 7 | 森川正章 | 北海道大学シンポジウム『北大の研究者達がつむぐ微生物の世界』 | <i>Pseudomonas</i> 属細菌の環状リポペプチド生産制御機構 | 北海道大学 (招待講演) | 2009.12.18. |
| 8 | 鈴木和也、山賀文子、鷺尾健司、森川正章 | 日本農芸化学会 2010 年度大会 | ウキクサから単離したアルカン分解根圏細菌の評価 | 東京大学駒場キャンパス | 2010.3.28-3.29. |

添付資料

| | | | | | |
|----|---|-----------------------------|---|-----------------|-----------------|
| 9 | 伊東義兼、松本光史、鷺尾健司、森川正章 | 日本農芸化学会 2010年度大会 | フロックを形成するアンモニア酸化細菌の単離ならびにその諸性質 | 東京大学駒場キャンパス | 2010.3.28-3.29. |
| 10 | 鷺尾健司、Siew Ping Lim、Niran Roongsawang、森川正章 | 日本農芸化学会 2010年度大会 | (p)ppGpp の合成・代謝酵素 SpoT による環状リポペプチドの生産制御 | 東京大学駒場キャンパス | 2010.3.28-3.29. |
| 11 | 坂上景子、伊東義兼、松本光史、鷺尾健司、森川正章 | 日本農芸化学会 2010年度大会 | <i>Nitrosomonas europaea</i> のアンモニア酸化活性に影響を与える従属栄養細菌 | 東京大学駒場キャンパス | 2010.3.28-3.29. |
| 12 | M. Morikawa | Biosurfactant workshop 2009 | Genetic analysis of synthetic regulation and transportation of lipopeptide type biosurfactant. | ベトナム・ハノイ (招待講演) | 2009.4.28-29 |
| 13 | K. Washio, M. Morikawa | Japan-Argentina Workshop | Biofilm formation and effective production of menaquinone-7 (Vitamin K2) by <i>Bacillus subtilis</i> : Lost of the world in environmental bacteria. | アルゼンチン ブエノスアイレス | 2009. 8. 3 |

平成 22 年度

【特許】なし

【論文】4 件

| 番号 | 発表者 | 所属 | タイトル | 発表誌名、ページ番号 | 査読 | 発表年 |
|----|--|-------------------|---|--|----|------|
| 1 | Yamaga F, Washio K, Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境科学研究院 | Sustainable biodegradation of phenol by <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> P23 isolated from the rhizosphere of duckweed <i>Lemna aoukikusa</i> . | <i>Environ Sci Technol</i> , 44 , 6470-6474 | 有 | 2010 |
| 2 | Washio K, Lim SP, Roongsawang N, Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境科学研究院 | Identification and characterization of the genes responsible for the production of the cyclic lipopeptide arthrofactin by <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38. | <i>Biosci Biotechnol Biochem</i> , 74 , 992-999 | 有 | 2010 |
| 3 | 坂口直史, Taha, A. I. B. H. M., 牧 秀明, 濱田誠一, 森川正章, 奥山英登志. | 北海道大学大学院地球環境科学研究院 | サハリン油田開発に伴う原油汚染事故を想定したバイオレメディエーション技術の可能性. | 生物工学会誌, 88 , 150-157 | 有 | 2010 |
| 4 | Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境科学研究院 | Dioxygen activation responsible for oxidation of aliphatic and aromatic hydrocarbon compounds: current state and variants. (Mini-review) | <i>Appl Microbiol Biotechnol</i> , 87 , 1596-1603 | 有 | 2010 |

【外部発表】15 件

| 番号 | 発表者 | 学会名等 | 発表タイトル | 発表場所 | 発表年月日 |
|----|-------------------------------|----------------|---|------------|-----------------|
| 1 | 伊東義兼、坂上景子、松本光史、鷺尾健司、森川正章 | 生化学会北海道支部例会 | 耐熱性を有する新規アンモニア酸化細菌の単離ならびにその諸性質 | 北海道大学 | 2010.7.23. |
| 2 | 坂上景子、伊東義兼、松本光史、鷺尾健司、森川正章 | 生化学会北海道支部例会 | アンモニア酸化細菌のアンモニア酸化活性に影響を与える従属栄養細菌 | 北海道大学 | 2010.7.23. |
| 3 | 漆畑 亘、阿形朋子、金井 保、跡見晴幸、今中忠行、森川正章 | 第 83 回日本生化学会大会 | 超好熱始原菌 <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 由来細胞表層タンパク質 Slp を発現する細菌の凝集性およびバイオフィーム形成能の評価 | 神戸ポートアイランド | 2010. 12. 7-10. |

| | | | | | |
|----|--|--|--|-------------------------|--------------------|
| 4 | 村上 峻、 グルニング ボルタ、 伊東義兼、森川正章 | 第83回日本生化学会大会 | 難分解性アゾ染料Orange Gを分解する細菌およびその還元酵素の精製 | 神戸ポートアイランド | 2010. 12. 7-10. |
| 5 | 伊東義兼、松本光史、 森川正章 | 日本農芸化学会 2011年大会 | 耐熱性を有する新規アンモニア酸化細菌の単離ならびに諸性質 | 京都女子大学 | 2011. 3. 25-28. |
| 6 | 高橋康徳、チャニター ブーンマク、森川正章 | 日本農芸化学会 2011年大会 | 好熱性アルカン分解細菌 <i>Geobacillus thremoleovorans</i> B23 由来 <i>alkB</i> 遺伝子の多様性解析 | 京都女子大学 | 2011. 3. 25-28. |
| 7 | 深野透、高橋康徳、 五味満裕、大崎幸彦、 森川正章 | 日本農芸化学会 2011年大会 | 便器表面初期付着細菌群の菌叢解析とバイオフィルム形成 | 京都女子大学 | 2011. 3. 25-28. |
| 8 | F. Yamaga, K. Washio, M. Morikawa. | 米国微生物学会大会 ASM110th | Sustainable biodegradation of phenol by a symbiotic <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> P23 that was isolated from the rhizosphere of duckweed <i>Lemna aoukikusa</i> . | 米国サンディエゴ | 2010. 5. 24. |
| 9 | M. Morikawa, K. Yamazaki, H. Aibara, K. Washio. | BIT's 3 rd Annual World Congress of Industrial Biotechnology | Enhanced production of vitamin K2 by <i>Bacillus subtilis</i> natto biofilms | 中国大連 (招待講演) | 2010. 7. 25. |
| 10 | M. Morikawa. | BIT's 1 st Annual World Congress of Petromicrobiology | Origin of peroxisomal beta-oxidation pathway suggested by extremely thermophilic alkane degrading bacteria. | 中国大連 (招待講演) | 2010. 7. 26. |
| 11 | K. Oki, K. Washio, D. Matsui, Y. Hirata, M. Morikawa | 国際バイオテクノロジー シンポジウム IBS2010 | The role of urease activity on biofilm and urolith formation by <i>Staphylococcus</i> sp. T-02 that was isolated from a toilet bowl. | イタリアリミニ | 2010. 9. 15-19. |
| 12 | M. Morikawa. | China-Japan Workshop on Novel Remediation Technologies for Wastewater Environment Conservation | Biofilm formation on the duckweed roots expands substrate specificity of alkane degrading rhizobacteria | 中国北京 (招待講演) | 2010. 10.14 |
| 13 | 森川正章 | 広島大学理学部生物 科学科セミナー | バイオフィルム工学—基礎研究から物質生産と環境技術への展開— | 広島大学 (招待講演) | 2010. 9. 30. |
| 14 | 森川正章 | 北海道バイオ産業 技術シーズ講演会 | ウキクサ根圏細菌を利用した持続的水質浄化技術 | 札幌アスペン ホテル (招待講演) | 2010. 10. 21. |
| 15 | 森川正章 | 北海道大学大学院 農学研究院寄付分 野講演会 | 根圏作用を高度利用した光駆動型バイオ環境浄化技術の開発 | 北海道大学 | 2010. 12. 1. |

【受賞実績】 1件

| 番号 | 受賞者 | 学会名等 | 受賞名 | 受賞年月 |
|----|------|---------|--------------|--------|
| 1 | 森川正章 | 日本農芸化学会 | 第8回農芸化学研究企画賞 | 2011.3 |

平成23年度

【特許】なし

【論文】5件

| 番号 | 発表者 | 所属 | タイトル | 発表誌名、ページ番号 | 査読 | 発表年 |
|----|--|-----------------------|---|---|----|------|
| 1 | Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境 科学研究院 | Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. | <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 12 (1), 141-172 | 有 | 2011 |
| 2 | Washio K, Lim SP, Roongsawang N, Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境 科学研究院 | A truncated form of SpoT, including the ACT domain, inhibits the production of cyclic lipopeptide | <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 75 (10), 1880-1888 | 有 | 2011 |

| | | | | | | |
|---|--|-------------------|---|---|---|------|
| | | | arthrofactin, and is associated with moderate elevation of guanosine 3',5'-bispyrophosphate level in <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38. | | | |
| 3 | Tojo F, Itoh Y, Okabe S, Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境科学研究科 | Analyses of three dominant membrane proteins from anammox planctomycete <i>Candidatus 'Brocadia sinica.'</i> | <i>J. Environ. Biotechnol.</i> 11(1-2), 77-81 | 有 | 2011 |
| 4 | Shimada K, Itoh Y, Washio K, Morikawa M. | 北海道大学大学院地球環境科学研究科 | Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading <i>Pseudomonas stutzeri</i> T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms. | <i>Chemosphere</i> 87, 226-233 | 有 | 2012 |
| 5 | 森川正章 | 北海道大学大学院地球環境科学研究科 | 第4章3節 RGR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) の環境保全・修復への利用 | 池 道彦、平田収正監修「植物機能のポテンシャルを活かした環境保全・浄化技術」 pp 169-176 | 無 | 2011 |

【外部発表】 23件

| 番号 | 発表者 | 学会名等 | 発表タイトル | 発表場所 | 発表年月日 |
|----|---|--|--|---------------|----------------|
| 1 | 森川正章、高橋康徳 | 環境バイオテクノロジー学会 2011年度大会 | 原油汚染土壌修復技術へのバイオフィルムの適用 | 東京大学 | 2011.6.20-21. |
| 2 | 森川正章、栄木悠、 柞木田なつみ、 鷺尾健司 | 第63回日本生物工学会大会 | <i>Marinobacter</i> 属細菌と共存する親属海洋細菌の混合バイオフィルム形成 | 東京農工大学 | 2011.9.26-28. |
| 3 | C. Boonmak, Y. Takahashi, M. Morikawa. | 第63回日本生物工学会大会 | Analysis of LadA-related long-chain alkane monooxygenase in an extremely thermophilic <i>Geobacillus thermoleovorans</i> B23. | 東京農工大学 | 2011.9.26-28. |
| 4 | 漆畑亘、船山哲、 森川正章 | 第12回極限環境生物学会 | 海底油田から単離した高度好熱菌 <i>Coprothermobacter</i> sp. PM9-2 株の諸特性解析 | 長崎大学 | 2011.11.27-28. |
| 5 | F. Tojo, Y. Itoh, S. Okabe, M. Morikawa. | 第一回国際アナムモックスシンポジウム | Analysis of the granule formation by Anammox bacteria. | 熊本大学 | 2011.5.19-20 |
| 6 | Y. Itoh, M. Matsumoto, M. Morikawa. | 111 th ASM General Meeting | Isolation of a Novel Thermotolerant Ammonia-Oxidizing Bacterium, <i>Nitrosomonas thermotolerans</i> JPCCT2, from Activated Sludge in a Thermal Power Station in Japan. | 米国ニューオーリンズ | 2011.5.21-24. |
| 7 | M. Morikawa. | FEMS 2011 4 th Congress of European Microbiologists | Co-beneficial biofilms on the duckweed roots. | スイス ジュネーブ | 2011.6.26-30. |
| 8 | S. Chida, M. Morikawa. | IUMS2011 | Identification of novel plant-growth promoting factor produced by <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> P23, a rhizobacterium of <i>Lemna aoukikusa</i> . | 札幌コンベンションセンター | 2011.9.6-10. |
| 9 | T. Fukano, Y. Takahashi, M. Gomi, Y. Osaki, M. Morikawa. | IUMS2011 | Isolation and characterization of <i>Rhizobium</i> sp. R8 that forms biofilms on a toilet bowl. | 札幌コンベンションセンター | 2011.9.6-10. |
| 10 | Y. Itoh, M. Matsumoto, M. Morikawa. | IUMS2011 | A novel thermotolerant ammonia-oxidizing bacterium, <i>Nitrosomonas thermotolerans</i> JPCCT2, was isolated from activated sludge in a thermal power station in Japan. | 札幌コンベンションセンター | 2011.9.6-10. |
| 11 | C. Boonmak, Y. Takahashi, M. Morikawa. | IUMS2011 | Analysis of multiple <i>alkB</i> genes from <i>Geobacillus thermoleovorans</i> B23. | 札幌コンベンションセンター | 2011.9.6-10. |
| 12 | S. Murakami, V. Gurning, Y. Itoh, | IUMS2011 | Purification of azoreductase from a bacterium strain that degrades Orange G | 札幌コンベンションセンター | 2011.9.6-10. |

| | | | | | |
|----|---|--|--|-------------------|-----------------|
| | M. Morikawa. | | dye. | ー | |
| 13 | K. Sakagami, Y. Itoh, M. Matsumoto, M. Morikawa. | IUMS2011 | Isolation of an aerobic chemoheterotroph that positively affects the activity of ammonia-oxidizing bacteria. | 札幌コンベンションセンター | 2011.9.6-10. |
| 14 | T. Agata, W. Urushibata, T. Kanai, H. Atomi, T. Imanaka, M. Morikawa. | Thermophiles | Functional characterization of <i>Thermococcus kodakaraensis</i> s-layer protein in <i>E. coli</i> . | 米国モンタナ州 | 2011.9.11-9.16. |
| 15 | W. Urushibata, T. Funayama, M. Morikawa. | 国際長期生体学研究ネットワーク (ILTER) 年次会議 2011 | An extremely thermophilic bacterium, <i>Coprothermobacter</i> sp. PM9-2, isolated from an offshore petroleum reservoir in the South China Sea. | 北海道大学 | 2011.9.5-9.9. |
| 16 | M. Morikawa. | China-Japan Workshop on Novel Remediation Technologies for Wastewater Environment Conservation | Enhancement of water purification activity by reconstructing rhizobacterial community. | 中国上海 | 2011.10.27-30 |
| 17 | 森川正章 | 農芸化学会研究企画賞受賞講演 | 根圏作用を高度利用した次世代型環境浄化技術の開発 | 京都会館 (招待講演) | 2011.3.25. |
| 18 | 森川正章 | 室蘭工業大学セミナー | 生物界面活性剤と微生物膜 | 室蘭工業大学 (招待講演) | 2011.7.14. |
| 19 | 森川正章 | 歯科保存学会シンポジウム | 有益なバイオフィルムの環境技術への利用 | 大阪国際交流センター (招待講演) | 2011.10.20. |
| 20 | 森川正章 | バイオミメティクス研究会シンポジウム | バイオフィルムの形成～微生物の優れた生存戦略 | 北海道大学 (招待講演) | 2011.12.7. |
| 21 | 坂上景子、伊東義兼、生田 創、三輪京子、松本光史、森川正章 | 日本農芸化学会 2012 年大会 | <i>Nitrosomonas europaea</i> IF014298 のアンモニア酸化活性を向上させる作用メカニズムの解析 | 京都女子大学 | 2012.3.24 |
| 22 | 倉科光紀、三輪京子、森川正章 | 日本農芸化学会 2012 年大会 | さまざまなプラスチック表面における細菌バイオフィルム形成量の比較 | 京都女子大学 | 2012.3.25 |
| 23 | 深野 透、高橋康徳、五味満裕、大崎幸彦、三輪京子、森川正章 | 日本農芸化学会 2012 年大会 | 便器表面より単離した <i>Rhizobium</i> 属細菌 R8 株のバイオフィルム形成に関する生体分子 | 京都女子大学 | 2012.3.25 |

年度毎の特許、論文、外部発表等リスト

北海道大学工学研究院

【論文】
2011年

| 番号 | 発表者 | 所属 | タイトル | 発表誌名、ページ番号 | 査読 | 発表年 |
|----|---|-------------------|---|---|----|-------|
| 1 | Okabe, S., Oshiki, M., Takahashi, Y., and Satoh, H. | 北海道大学大学 院工学研究院 | N ₂ O emission from a partial nitrification-anammox process and identification of a key biological process of N ₂ O emission from anammox granules. | Water Research, 45 (19), 6461-6470. | 有 | 2011年 |
| 2 | Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H., and Okabe, S. | 北海道大学大学 院工学研究院 | Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium ' <i>Candidatus</i> Brocadia Sinica' | Microbiology, 157 , 1706-1713. | 有 | 2011年 |
| 3 | Okabe, S., Oshiki, M., Takahashi, K., and Satoh, H. | 北海道大学大学 院工学研究院 | Development of long-term stable partial nitrification and subsequent anammox process. | Bioresource Technology, 102 (13), 6801-6807. | 有 | 2011年 |
| 4 | Cho, S., Fujii, N., Lee, T., and Okabe, S. | 北海道大学大学 院工学研究院 | Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor. | Bioresource Technology, 102 (2), 652-659. | 有 | 2011年 |

2010年

| | | | | | | |
|---|---|-------------------|---|-------------------------------------|---|-------|
| 5 | Cho, S., Takahashi, Y., Fujii, N., Yamada, Y., Satoh, H., and Okabe, S. | 北海道大学大学 院工学研究院 | Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. | Chemosphere, 78 , 1129-1135. | 有 | 2010年 |
|---|---|-------------------|---|-------------------------------------|---|-------|

2007年

| | | | | | | |
|---|------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|----------------------|---|-------|
| 6 | 高橋 慶考、 對馬 育夫、 下川 正貴、 岡部 聡 | 北海道大学大学 院工学研究院 | 二段ステップ流入式上向流型 ANAMMOX リアクターにおける処理性の評価 | 環境工学論文集, 44, 201-206 | 有 | 2007年 |
|---|------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|----------------------|---|-------|

年度毎の特許、論文、外部発表等

電力中央研究所

【特許】

| 番号 | 出願者 | 公開番号 | 国内 外国 PCT | 出願日 | 状態 | 名 称 | 発明者 |
|----|------------|-------------------|-----------------|------------|----|--|-------|
| 1 | (財)電力中央研究所 | 特開 2010-207193 | 国内 | 2009/03/12 | 公開 | 電気培養方法及び電気培養装置 | 平野伸一他 |
| 3 | (財)電力中央研究所 | 特開 2011-177618 | 国内 | 2010/02/26 | 公開 | メタン発酵処理方法 | 森田仁彦他 |
| 2 | (財)電力中央研究所 | 特開 2011-062195 | 国内 | 2010/03/31 | 公開 | 微生物群担持担体の作製方法並びに微生物を利用した物質処理方法及び物質生産方法 | 森田仁彦他 |
| 4 | (財)電力中央研究所 | 特開 2011-223895 | 国内 | 2010/04/15 | 公開 | 水素資化性メタン菌のメタン生成活性制御方法 | 平野伸一他 |
| 5 | (財)電力中央研究所 | 特開 2011-223988 | 国内 | 2011/03/03 | 公開 | 発酵処理装置 | 森田仁彦他 |

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

【論文】

| 番号 | 発表者 | タイトル | 発表誌名、ページ 番号 | 査読 | 発表 年 |
|----|--|--|---|----|---------|
| 1 | Kengo Sasaki, Masahiko Morita, Shin-ichi Hirano, Naoya Ohmura and Yasuo Igarashi | Effect of adding carbon fiber textiles to methanogenic bioreactors used to treat an artificial garbage slurry | J. Biosci. Bioeng., 108: 130-135 | 有 | 2009 |
| 2 | Kengo Sasaki, Daisuke Sasaki, Masahiko Morita, Shin-ichi Hirano, Norio Matsumoto, Naoya Ohmura and Yasuo Igarashi | Efficient treatment of garbage slurry in methanogenic bioreactor packed by fibrous sponge with high porosity | Appl. Microbiol. Biotechnol., 86: 1573-1583 | 有 | 2010 |
| 3 | Kengo Sasaki, Daisuke Sasaki, Masahiko Morita, Shin-ichi Hirano, Norio Matsumoto, Naoya Ohmura and Yasuo Igarashi | Bioelectrochemical system stabilizes methane fermentation from garbage slurry | Bioresource Technol., 101: 3415-3422 | 有 | 2010 |
| 4 | Kengo Sasaki, Masahiko Morita, Shin-ichi Hirano, Daisuke Sasaki, Naoya Ohmura and Yasuo Igarashi | Efficient degradation of rice straw in the reactors packed by carbon fiber textiles | Appl. Microbiol. Biotechnol., 87: 1579-1586 | 有 | 2010 |
| 5 | Kengo Sasaki, Masahiko Morita, Daisuke Sasaki, Shin-ichi Hirano, Norio Matsumoto, Naoya Ohmura and Yasuo Igarashi | Methanogenic communities on the electrodes of bioelectrochemical reactors without membranes | J. Biosci. Bioeng., 111: 47-49 | 有 | 2011 |
| 6 | Kengo Sasaki, Shin-ichi Hirano, Masahiko Morita, Daisuke Sasaki, Norio Matsumoto, Naoya Ohmura and Yasuo Igarashi | Bioelectrochemical system accelerates microbial growth and degradation of filter paper | Appl. Microbiol. Biotechnol., 89: 449-455 | 有 | 2011 |
| 7 | Kengo Sasaki, Masahiko Morita, Shin-ichi Hirano, Naoya Ohmura and Yasuo Igarashi | Decreasing ammonia inhibition in thermophilic methanogenic bioreactors using carbon fiber textiles | Appl. Microbiol. Biotechnol., 90: 1555-1561 | 有 | 2011 |
| 8 | Kengo Sasaki, Masahiko Morita, Daisuke Sasaki, Shin-ichi Hirano, Norio Matsumoto, Atsushi Watanabe, Naoya Ohmura, and Yasuo Igarashi | A bioelectrochemical reactor containing carbon fiber textiles enables efficient methane fermentation from garbage slurry | Bioresource Technol., 102: 6837-6842 | 有 | 2011 |
| 9 | 松本伯夫, 平野伸一 | 電気培養 | バイオ電池の最新動向, 第7章:188-211 | 無 | 2011 |

【学会発表等】

| 番号 | 発表者 | タイトル | 学会名 | 発表年 |
|----|--|--|--|------|
| 1 | 佐々木建吾、森田仁彦、平野伸一、松本伯夫、植本弘明、大村直也、堀知行、春田伸、五十嵐泰夫 | 固定床式メタン発酵槽における担体充填の効果 | 日本農芸化学会 2008年度大会 | 2008 |
| 2 | 佐々木建吾、森田仁彦、平野伸一、松本伯夫、植本弘明、大村直也、佐々木大介、春田伸、五十嵐泰夫 | 担体の表面性質が固定床式メタン発酵に及ぼす影響 | 日本生物工学会 2008年度大会 | 2008 |
| 3 | 佐々木建吾、森田仁彦、平野伸一、松本伯夫、植本弘明、大村直也、佐々木大介、春田伸、五十嵐泰夫 | 三次元構造を持つ担体が固定床式メタン発酵に及ぼす影響 | 日本農芸化学会 2009年度大会 | 2009 |
| 4 | 佐々木建吾、森田仁彦、平野伸一、松本伯夫、植本弘明、大村直也、佐々木大介、五十嵐泰夫 | 担体への通電が固定床式メタン発酵に及ぼす効果 | 日本生物工学会 2009年度大会 | 2009 |
| 5 | 佐々木建吾、森田仁彦、平野伸一、松本伯夫、渡邊淳、植本弘明、大村直也、佐々木大介、五十嵐泰夫 | 固形性廃棄物からのメタン発酵に対する定電位電解の効果 | 日本農芸化学会 2010年度大会 | 2010 |
| 6 | Shin-ichi Hirano, Norio Matsumoto and Naoya Ohmura | Regulation of growth and respiratory activity of anaerobes by electrolysis | 110th General Meeting of the American Society for Microbiology | 2010 |
| 7 | 佐々木建吾、森田仁彦、平野伸一、佐々木大介、渡邊淳、松本伯夫、植本弘明、大村直也、五十嵐泰夫 | 固定床式メタン発酵のアンモニア耐性 | 日本生物工学会 2010年度大会 | 2010 |
| 8 | 平野伸一、松本伯夫、佐々木建吾、大村直也 | 電気をを用いて微生物の生育を制御する培養方法および培養装置 | 日本生物工学会 2010年度大会 | 2010 |
| 9 | 平野伸一、松本伯夫、大村直也 | メタン発酵に関わる微生物の電気培養 | 日本生物工学会 2010年度大会 | 2010 |
| 10 | 佐々木大介、佐々木建吾、渡邊淳、森田仁彦、平野伸一、松本伯夫、植本弘明、大村直也、五十嵐泰夫 | 有機性廃棄物を処理する通電型高温メタン発酵槽の性能評価 | 日本農芸化学会 2011年度大会 | 2011 |
| 11 | 佐々木建吾、森田仁彦、渡邊淳、石井正治、五十嵐泰夫 | 有機性廃棄物からの水素・メタン発酵 | 第11回東京大学生命科学シンポジウム | 2011 |
| 12 | 佐々木大介、佐々木建吾、渡邊淳、森田仁彦、平野伸一、松本伯夫、植本弘明、大村直也、五十嵐泰夫 | 実廃棄物を用いた通電型固定床高温メタン発酵の性能評価 | 日本生物工学会 2011年度大会 | 2011 |

【その他公表】

| 番号 | タイトル | 新聞・雑誌等 | 発表年月日 |
|----|-----------------------|---------------------------|------------|
| 1 | 微生物を効率培養 | 日経産業新聞 | 2009/10/26 |
| 2 | 電圧加え処理能力3倍 | 日経産業新聞 | 2010/10/6 |
| 3 | 電力中央研究所、生ごみからメタンガスを回収 | 環境エネルギー産業情報, No.42 p17 | 2010/11 |

(環境安心イノベーションプログラム・エネルギーイノベーションプログラム)
「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

「環境安心イノベーションプログラム」は、資源制約を克服し、環境と調和した持続的な経済・社会の実現と、安全・安心な国民生活を実現するため、革新的な技術の開発等を通じた地球全体での温室効果ガスの排出削減、廃棄物の発生抑制（リデュース）、製品や部品の再使用（リユース）、原材料としての再利用（リサイクル）推進による循環型社会の形成、バイオテクノロジーを活用した環境に優しい製造プロセスや循環型産業システムの創造、化学物質のリスクの総合的な評価及びリスクを適切に管理する社会システムの構築を推進するものである。本プロジェクトは上記プログラムの一環として、「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発/微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術」を開発する。

我が国が取り組むべき火急の課題である、環境負荷の低減と省エネルギー化の促進による循環型産業社会の構築には、物質生産プロセス（モノ作り）とその後処理の両面における技術開発が必要である。後処理においては、第3期科学技術基本計画（平成18年3月制定）における重点推進4分野の一つであるライフサイエンス分野において、「生物機能を活用した環境対応技術開発」が重要な研究開発課題として位置付けられる等、生物機能を活用した廃水、廃棄物の処理技術の高効率・高度化が求められている。

従来の産業における廃水・廃棄物処理技術は、①エネルギー多消費・廃棄物多排出、②低処理能力・対象廃棄物限定等といった課題を抱えている。例えば、①については、現行の廃水処理方法において、活性汚泥法が全体の約8割を占めており、その曝気に必要な電力量を石油換算エネルギーとして換算すると日本全体のエネルギー需要量の少なくとも約1.9%を占め、エネルギー消費量が多い。また、現在の廃水処理から発生する余剰汚泥や未利用有機性廃棄物の焼却・埋立処分に係るエネルギー・コストも相当なものになっている。現状のメタン発酵法においても、適用困難なものも含め年間発生する有機性廃棄物の総量約3億トンのうち、適用困難な対象の未利用食品廃棄物は年間約1,760万トンに上っている状況である。②については、産業が多様化する中、多種多様な産業廃水・廃棄物（高濃度廃水や難分解性物質を含む）に適用可能な処理技術の開発が必要とされている。

これまで、このような課題に対し様々な工学的アプローチによる高度化はなされてきたものの、微生物群自体については、依然としてブラックボックスのままであり、自然の摂理の域を出ていなかった。近年になり、我が国の関連研究開発プロジェクトをはじめ国内外において、廃水、廃棄物の処理における主要な微生物群の分離、同定、機能解明及び主要微生物群のモニタリング技術等の開発が進められ、知見が集積されつつある。

そこで、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO」という。）は特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持技術、また空間配置・優占化技術（これらの技術を以下、「デザイン化技術」と呼ぶ）等を開発することにより微生物群の処理効率を大幅に向上させるなど、処理技術の課題を克服することを目指して本プロジェクトを実施する。

本プロジェクトでは、我が国の有する知見を活かしつつ、微生物群のデザイン化技術等を開発することにより、省エネルギーで余剰汚泥を大幅に削減し、コンパクトでメンテナンスが容易であり、あるいは多様な廃水・廃棄物への適用が可能になる高効率型廃水、廃棄物処理（主として活性汚泥法・メタン発酵法を対象）の基盤技術を確立し、微生物機能を活用した環境調和型産業システムの創造に資する技術を開発することを目的とする。

(2) 研究開発の目標

最終目標（平成23年度末）

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

特定有用微生物（群）を、人為的に安定導入・維持するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価する技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来の標準活性汚泥法の処理プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来の標準活性汚泥法の処理プロセスでのエネルギー使用量の約2/3の削減を図ること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

特定有用微生物（群）を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価するための技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来のメタン発酵プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、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の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大を可能とすること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

中間目標（平成21年度末）

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

特定有用微生物（群）を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群に人為的に安定導入・維持するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、以上の開発された技術とその機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の成果とを合わせて、約3倍の高効率化の見通しが確実に得られていること。

- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

特定有用微生物群を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群内において人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせ、従来のメタン発酵槽に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現する見通しが得られていることとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大の見通しが確実に得られていること。

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を委託により実施する。

- ① 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発
- ② 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発実施体制

本研究開発は、NEDOが公募により選定し、研究を委託する、原則、本邦の企業、研究組合、公益法人、独立行政法人、大学等の研究機関（原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。）が、NEDOが指名した研究開発責任者（プロジェクトリーダー）の下で、それぞれの研究テーマの達成目標を実現すべく研究開発を実施する方式を採用する。

この場合において、各委託先は、企業、研究組合、公益法人、独立行政法人、大学等の単位であることを原則とする（以下、「企業単位等」という）。ただし、複数の企業単位等が結集して研究体を構成し、集中的な管理体制を構築する場合も、当該研究体を委託先として認めるものとする。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDOに設置する技術審議委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じてプロジェクトの進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成19年度から平成23年度までの5年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDOは、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成21年度、事後評価を平成24年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じてプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発のうち、下記共通基盤技術に係る成果については、NEDO、実施者とも普及に努めるものとする。

- ・ 好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）の人為的な安定的導入・維持するための技術の開発並びに開発された技術とデザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の開発
- ・ 嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発並びに開発された技術とデザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の開発

② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化等との連携を図るため、データベースへのデータの提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③ 知的財産権の所属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、

すべて受託者に帰属させることとする。

(2) 基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、内外の研究開発動向、産業技術政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) プロジェクトの根拠法

本プロジェクトは、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第一号ニに基づき実施する。

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成19年3月、制定。

(2) 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1) 研究開発の目的」の記載を改訂。

(3) 平成22年3月、実用化開発を集中的に進めるため、研究開発の目標を改訂。

(4) 平成23年7月7日、非化石エネルギーの開発及び導入の促進に関する法律の施行により、根拠法を改定。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①好気性微生物処理技術における特定有用微生物（群）を人為的に安定的導入・維持するための技術の開発

1. 研究開発の必要性

処理効率が頭打ち状態にある従来の好氣的産業廃水処理技術の飛躍的な処理効率向上を実現するためには、産業廃水等の処理に最適な機能を持つ微生物群を人為的に制御することが必要である。そのためには、特定有用微生物（群）を人為的に安定導入・維持するための技術や、必要に応じて処理にとってマイナス要因となる微生物（群）を排除する技術等の基盤を開発することにより、高効率処理を可能とする微生物群をデザイン化するとともに、この微生物群の機能を処理プロセスで最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発することが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 特定有用微生物（群）の選抜と特性評価

集団を構成する微生物群に導入、維持するための特定有用微生物（群）を選抜、特定し、これらの特性評価を行う。

(2) 特定有用微生物（群）の安定的導入・維持技術の開発

集団を構成する微生物群へ特定有用微生物（群）を安定的に導入する技術、特定有用微生物（群）を安定的に優占化・維持するための技術、また、必要に応じて、処理にとってマイナス要因となる微生物（群）を排除する技術を開発する。

(3) 集団を構成する微生物群の処理機能の技術的有効性評価

デザイン化技術により得られた集団を構成する微生物（群）について、構成微生物のモニタリングや機能解析、処理効率を調べることにより、有効性を評価する。

(4) バイオエンジニアリング技術の開発

(2) で開発した技術により得られた微生物群の機能を最大限発揮させるための総合的なバイオエンジニアリング技術を開発する。

(5) デザイン化された微生物群の総合評価

特定有用微生物（群）を安定的に導入・維持するための技術の開発によってデザイン化された微生物群に(4)で開発したバイオエンジニアリング技術を適用し、処理効率等を評価する。

また、研究開発項目②で得られる微生物群を組み合わせた場合の処理効率等も調べることにより、実用化の可能性を総合的に評価する。

3. 達成目標

(1) 最終目標（平成23年度末）

特定有用微生物（群）を、人為的に安定導入・維持するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価する技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果と組み合わせることにより、従来の標準活性汚泥法の処理プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、従来の標準活性汚泥法の処理プロセスでのエネルギー使用量の約2/3の削減を図ること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

(2) 中間目標（平成21年度末）

特定有用微生物（群）を選抜・評価し、それらを集団を構成する微生物群に人為的に安定導入・維持するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、以上の開発された技術とその機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の成果とを合わせて、約3倍の高効率化の見通しが確実に得られていること。

研究開発項目②嫌気性微生物処理技術における特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術の開発

1. 研究開発の必要性

処理効率が頭打ち状態にある従来の嫌氣的産業廃水・廃棄物処理技術の飛躍的な処理効率向上を実現するためには、廃水・廃棄物等の処理に最適な機能を持つ微生物群を人為的に制御することが必要である。そのためには、微生物と固体表面との相互作用及び微生物間の相互作用の解析・把握に基づき、特定有用微生物群を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術等の基盤を開発することにより、高効率処理を可能とする微生物群をデザイン化するとともに、この微生物群の機能を処理プロセスで最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発することが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 特定有用微生物群の特性・機能評価

高効率処理を実現するために、優占的かつ安定的に維持すべき微生物群を特定し、それらの機能や特性を評価する。

(2) 特定有用微生物群のデザイン化技術の開発

特定した有用微生物と固体表面との相互作用及び微生物間の相互作用を解析・把握することより、集団を構成する微生物群内において特定有用微生物群を空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術を開発する。

(3) 集団を構成する微生物群処理機能の技術的有効性評価

デザイン化技術により得られた集団を構成する微生物群について、構成微生物のモニタリングや機能解析、処理効率を調べることにより、有効性を評価する。

(4) バイオエンジニアリング技術の開発

(2) で開発した技術により、集団を構成する微生物群内において特定有用微生物群を空間的に配置し、その機能を最大限発揮させるための総合的なバイオエンジニアリング技術を開発する。

(5) デザイン化された微生物群の総合評価

特定有用微生物群を優先的かつ安定的に維持・空間配置する技術の開発によってデザイン化された微生物群に(4)で開発したバイオエンジニアリング技術を適用し、処理効率等(発酵槽容積のコンパクト化、滞留時間など)を評価する。

また、研究開発項目①で得られる微生物群を組み合わせた場合の処理効率等も調べることにより、実用化の可能性を総合的に評価する。

3. 達成目標

(1) 最終目標 (平成23年度末)

特定有用微生物(群)を人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するデザイン化技術が開発されており、微生物群の処理機能の技術的有効性を評価するための技術が開発されていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術を開発し、その成果を組み合わせることにより、従来のメタン発酵プロセスの約3倍の高効率化を図ること。これにより、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の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大を可能とすること。

さらに、実用化に資するための検証可能なテストプラント規模にて評価を行うこと。

(2) 中間目標 (平成21年度末)

特定有用微生物群を選抜・評価し、それらを、集団を構成する微生物群内において人為的に空間配置させ安定的に維持・優占化するための技術面での見通しが確実に得られていること。また、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の開発

での成果とを合わせ、従来のメタン発酵槽に比べて約50%のコンパクト化によりシステム効率の向上を実現する見通しが得られているとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大の見通しが確実に得られていること。

事前評価書

| | | 作成日 | 平成18年11月2日 |
|--------------------|--|-----|------------|
| 1. 事業名称 (コード番号) | 微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発 | | |
| 2. 推進部署名 | バイオテクノロジー・医療技術開発部 | | |
| 3. 事業概要 | <p>(1) 概要：従来の化学・食品産業等における活性汚泥法等の産業廃水・廃棄物等処理技術は、エネルギー多消費型・廃棄物多排出型であり、これまで省エネルギー等の効率化を追究すべく様々な工学的アプローチがなされてきたものの、頭打ち状態である。これは、微生物群の処理メカニズムについては、依然としてブラックボックスのままであり、自然の摂理の域を出ていないことによる。そこで、本プロジェクトでは、活性汚泥法、メタン発酵法等の抜本的な改善を図るべく、我が国の微生物のゲノム解析技術や複合微生物系研究開発等の進展を踏まえ、微生物群の機能を最大限発揮するため、微生物群の構成や配置等を人為的に制御する技術を開発することにより、省エネルギー効果が大きく、廃棄物を大幅に削減する高効率型廃水・廃棄物等処理の基盤技術を開発する。本技術の最終目標は以下の通りとする。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・平成23年度において、活性汚泥法、メタン発酵等の各処理技術における処理効率を従来型の標準的な廃水・廃棄物処理効率の3倍程度向上。 ・処理効率が3倍程度向上することより、そのエネルギー消費量を約70%、汚泥の発生量を約70%削減。 <p>(2) 事業規模：総事業費（国費分） 10億円（100%委託） (3) 事業期間：平成19年度～23年度（5年間）</p> | | |
| 4. 評価の検討状況 | <p>(1) 事業の位置付け・必要性</p> <p>環境負荷の低減と省エネルギー化の促進による循環型産業社会の構築は、我が国が取り組むべき火急の課題である。そのためには物質生産プロセスとその後処理の両面における技術開発が必要であり、後処理においては、第3期科学技術基本計画（平成18年3月制定）における重点推進4分野の一つであるライフサイエンス分野において、「生物機能を活用した環境対応技術開発」が重要な研究開発課題として位置付けられる等、生物機能を活用した廃水、廃棄物等の処理技術の高効率・高度化が求められている。</p> <p>従来の廃水・廃棄物等処理技術は、エネルギー多消費型・廃棄物多排出型であって、これまで様々な工学的アプローチによる高度化はなされてきたものの、微生物群自体については、依然としてブラックボックスのまま扱われてきた。本プロジェクトでは、廃水、廃棄物や汚染物質等の処理等のいわゆる静脈産業においても、最新のバイオテクノロジーを応用し、技術的革新を創出することで、高効率処理技術を開発し、省エネルギーで廃棄物を大幅に削減する環境調和型の静脈産業の創出を図る。</p> <p>グリーンバイオ分野の技術戦略マップにおいて「生物機能を活用した環境維持・修復技術」の中で排出源での効率的な処理における「微生物間相互作用の検出・応用技術」、「高効率微生物集団デザイン化技術」等に位置付けられている。</p> | | |

(2) 研究開発目標の妥当性

(目標)

- ① 従来の標準的廃水処理やメタン発酵プロセスの3倍程度の超高効率化を図る。
- ② 処理プロセスでのエネルギー使用量の約70%削減。
- ③ 汚泥の発生量の約70%削減。

(妥当性)

- ① 集団を構成する微生物群の機能が効率的に発現するためのデザイン化技術を次の通り開発することにより、従来の廃水処理やメタン発酵プロセスの3倍程度の高効率化を図る。また、海外では現在、微生物群のデザイン化技術の開発に取り組んでおらず、日本発のオリジナル技術の開発となり得る。
 - ・ 構成微生物群に対し、その相互関係の解析・把握に基づき、特定有用微生物を安定的に導入・強化する技術、特定有害微生物を除去する技術の開発。
 - ・ 微生物と固体表面との相互作用及び微生物間の相互作用の解析・把握に基づき、特定有用微生物群を安定的に維持・空間的に配置する技術の開発。
 - ・ さらに、デザイン化された微生物群の機能を最大限発揮させるためのバイオエンジニアリング技術の開発。
- ② 従来の活性汚泥法の3倍程度の処理効率化を図ることにより、処理プロセスでのエネルギー使用量の約70%の削減、並びに汚泥の発生量の約70%削減を図る。
- ③ 従来のメタン発酵法の3倍程度の超高効率化を図ることにより、リアクタの大幅なコンパクト化等システム効率の向上を実現するとともに、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物種への適用を可能とする。

(3) 研究開発マネジメント

公募を行い最適な研究体制を構築する。各研究開発課題は密接に連携を取る。プロジェクト開始後3年目に中間評価を予定しており、その評価結果を踏まえて事業全体について見直しを行うことを想定している。

また、NEDOにおいては環境技術開発部など関連する推進部のプロジェクトとの成果の共有や相互活用、さらには相乗効果を計るため、プロジェクト関係者や各種委員会の外部有識者が相互に委員会参加等の連携も検討する。

(4) 研究開発成果

国内の廃水処理施設の多くは、ここ10年の内に一斉に耐用年数に達し、更新の時期に当たるとされる。現在、廃水処理市場は、1.5兆円の規模であるが、今後、拡大が期待される。本事業の研究開発成果により革新的技術が創出されれば、この技術が導入される可能性が極めて高く、さらなる市場の発展が期待される。

また、本技術により、省エネ効果が期待される。例えば活性汚泥法を例にとれば、2030年で石油換算20.5万k1/年(各成功率10%を乗じた値)が見込まれる。これは我が国の活性汚泥法に使用される電力量は、日本全体の一般の電力需要の約1.9%をも占めるためであり、本技術開発による省エネ効果(約70%)のインパクトは極めて大きい。

メタン発酵についても、未利用食品残さ1,760万トン^{*1}を対象とした場合、現行の焼却法に比して、高効率メタン発酵を適用すれば石油換算17.8万k1/年(各成功率10%を乗じた値)の省エネ効果が見込まれる。

(5) 実用化・事業化の見通し

開発する技術は主に、有機物濃度の低い廃水から、有機物が高濃度に含まれ難分解性物質も含有する産業(工場)廃水等を適用対象とする。このように開発する技術は、前述のように、例えば、廃水・廃棄物処理施設に導入可能であり、産業廃水処理、廃棄物処理としての新規なコア技術として事業化が可能である。

(6) その他特記事項

5. 総合評価

本事業は、従来ブラックボックスとして取り扱われてきた各種微生物群(活性汚泥、メタン発酵汚泥等)に対し、その構成及びその空間配置を人為的に制御・設計することにより、集団としての機能を高めることで、廃水・廃棄物等の新規な高効率処理技術体系を構築するという、世界でもこれまでに組みのない日本発のオリジナル技術開発である。

処理対象や開発すべき各種要素技術が多岐に亘り、産学官連携体制での実施が望まれることから、NEDO主導で実施すべき事業である。

(注) 事業の全体像がわかる図表を添付すること。

※1 出典『バイオマス・ニッポン総合戦略』2006年3月閣議決定より

2. 分科会における説明資料

次ページより、プロジェクト推進・実施者が、分科会においてプロジェクトを説明する際に使用した資料を示す。

微生物群のデザイン化による 高効率型環境バイオ処理技術開発

実施期間:平成19年度～平成23年度

プロジェクトの概要(公開)

平成24年4月19日

NEDO バイオテクノロジー・医療技術部

01/45

発表内容

公開

- I 事業の位置付け・必要性
- II 研究開発マネジメント
- III 成果
- IV 実用化の見通し

NEDO
(長谷川)

藤田プロジェクト
リーダー(PL)

02/45

社会的背景

○日本の課題

環境負荷の低減と省エネルギー化の促進による循環型産業社会の構築

○必要な技術開発

モノ作りとその後処理

(バイオマス・ニッポン総合戦略：廃棄物系バイオマスの利用促進)

○処理方法の技術的課題

エネルギー多消費、廃棄物多排出

03/45

微生物群デザイン化への経緯

微生物による環境浄化の開始

→環境因子の操作で微生物群集の優先化を制御

よりきめの細かな微生物群集の制御法

→SRT制御(汚泥滞留時間)や、アンモニア酸化などに効果

より安定した制御法が実用段階へ

→グラニュール、固定化、膜分離の導入

デザイン化技術の開発

→微生物の構成・空間配置等の制御



04/45

デザイン化技術の定義

『微生物群の構成や配置等を 人為的に制御する技術』

- 微生物構成の制御
- 微生物群の空間的配置の制御
- 微生物コミュニティの制御

05/45

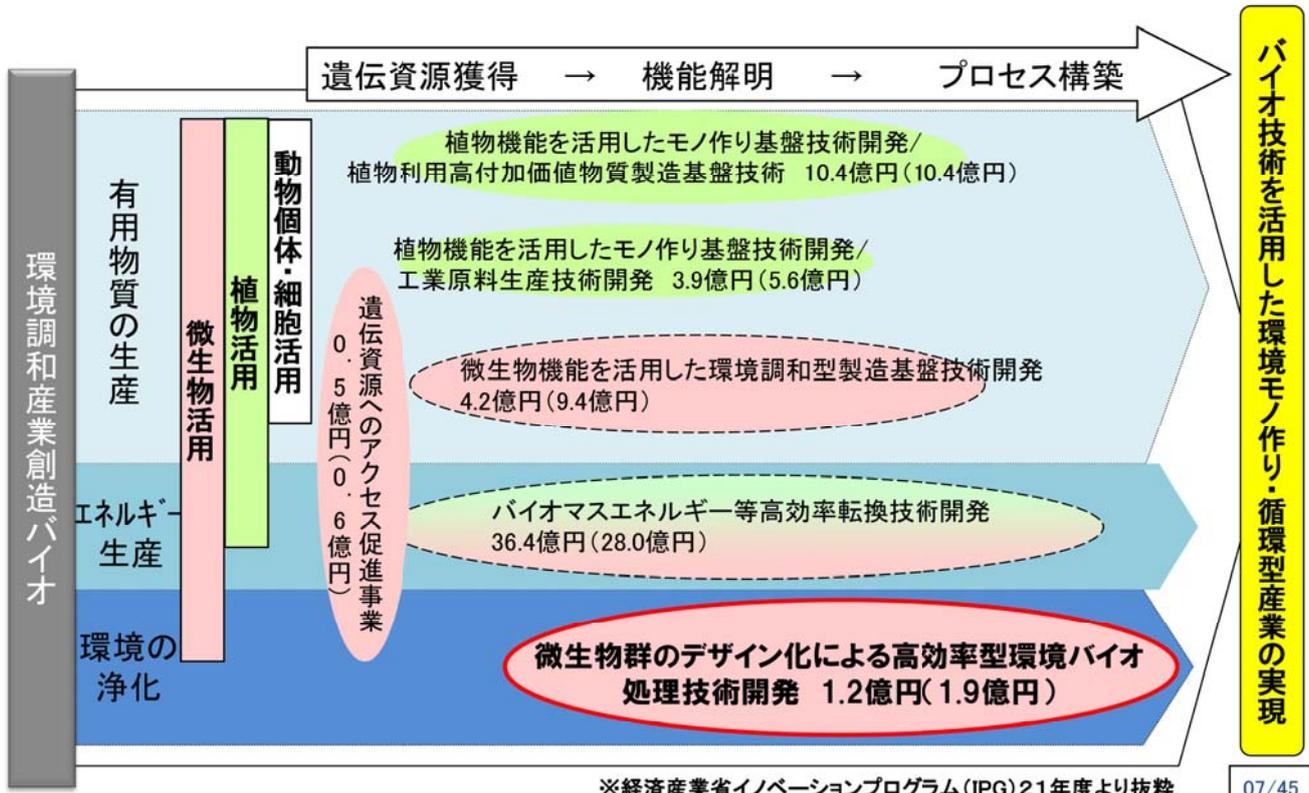
事業の目的

微生物群の**デザイン化技術**を開発することにより、**省エネルギー効果が大きく、廃棄物を大幅に削減する**

高効率型廃水・廃棄物等処理の**基盤技術**を確立する

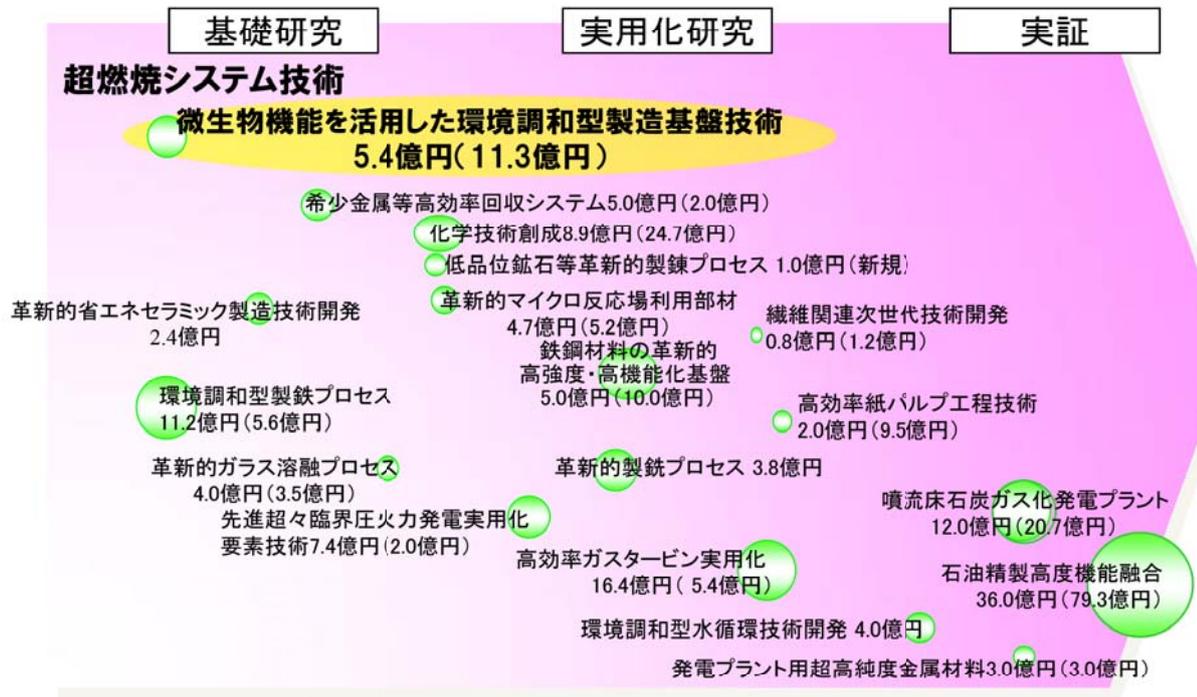
06/45

環境・安心イノベーションプログラムでの位置付け

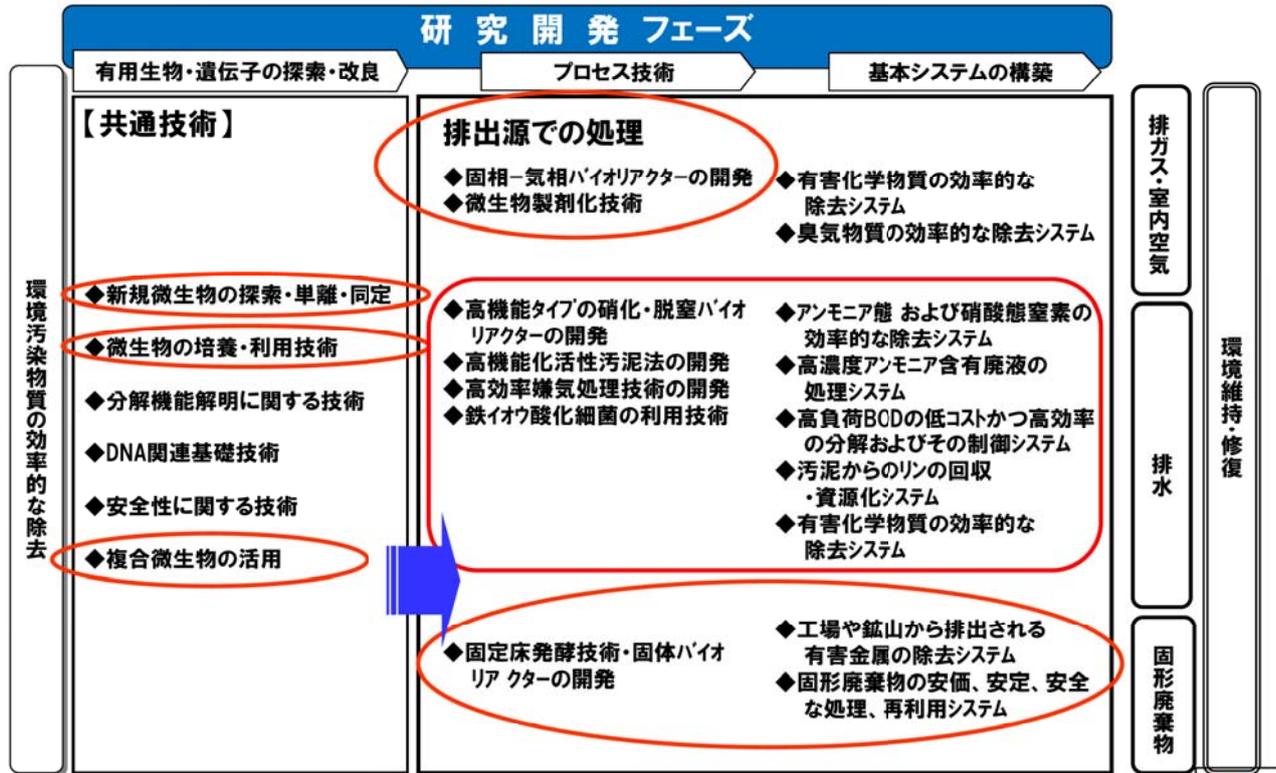


エネルギー・イノベーションプログラムでの位置付け

①総合エネルギー効率の向上



生物機能活用技術分野の技術マップでの位置付け



※生物機能活用技術分野の技術戦略マップ(2009)より抜粋

09/45

NEDOが、関与する意義

○産学官の連携体制が必要

微生物による廃水・廃棄物処理技術は頭打ち（エネルギー多消費）

- 微生物群自体はブラックボックス(基盤技術が未確立)
- 基盤技術を大学で開発し企業へフィードバック

○日本オリジナルの技術として、産業の高度化へ大きく貢献

デザイン化技術が確立できれば、現行の静脈産業の問題点を解決

- 日本オリジナルのプラットフォーム型技術を創出
- 基本特許の取得が世界に先駆けて可能
- 静脈産業の抜本改革による産業の高度化



NEDOの事業委託が適切

10/45

実施の効果の前提

○対象となるバイオマス

家畜排せつ物：約8,900万トン

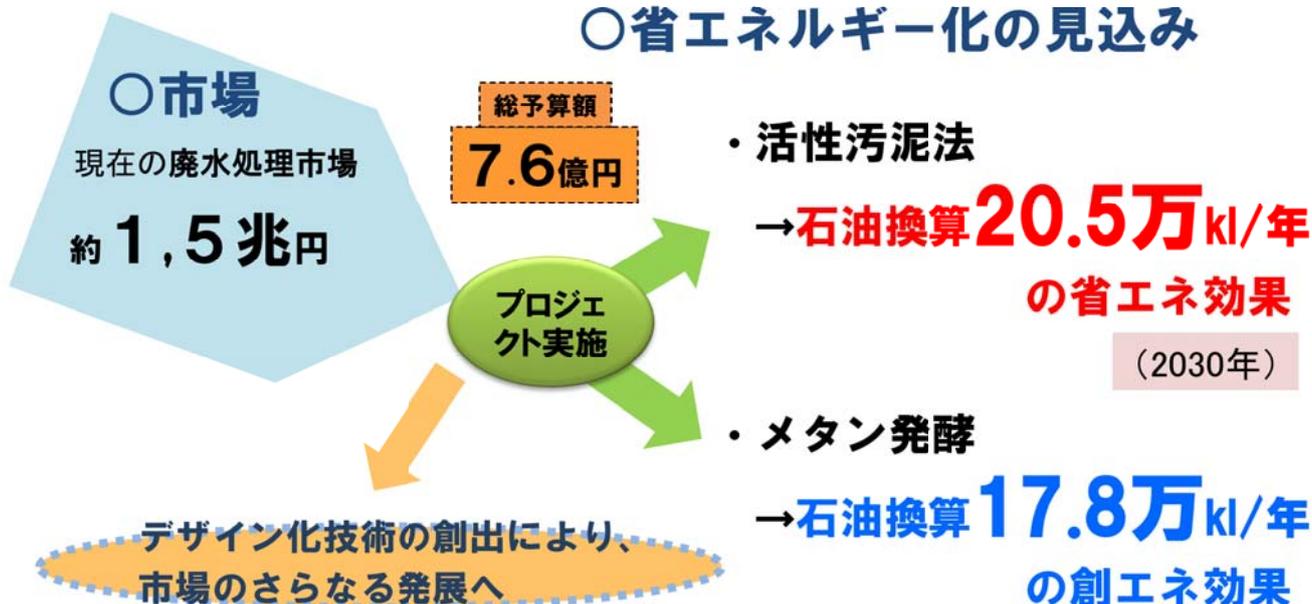
食品廃棄物：約2,200万トン

下水汚泥：7,500万トン（濃縮汚泥ベース）

（バイオマス・ニッポン総合戦略平成18年3月31日より）

実施の効果（費用対効果）

○省エネルギー化の見込み



| | |
|---------------|---------------|
| I 事業の位置付け・必要性 | NEDO (長谷川) |
| II 研究開発マネジメント | |
| III 成果 | 藤田PL |
| IV 実用化の見通し | |

13/45

最終目標(好気性微生物処理)

◎有用微生物群を人為的に安定的導入・維持する技術の開発

- ・ 従来の標準活性汚泥法の処理プロセス等の
約3倍の高効率化
これによる**エネルギー使用量の約2/3の削減**を実現
- ・ 検証可能なテストプラント規模にて評価

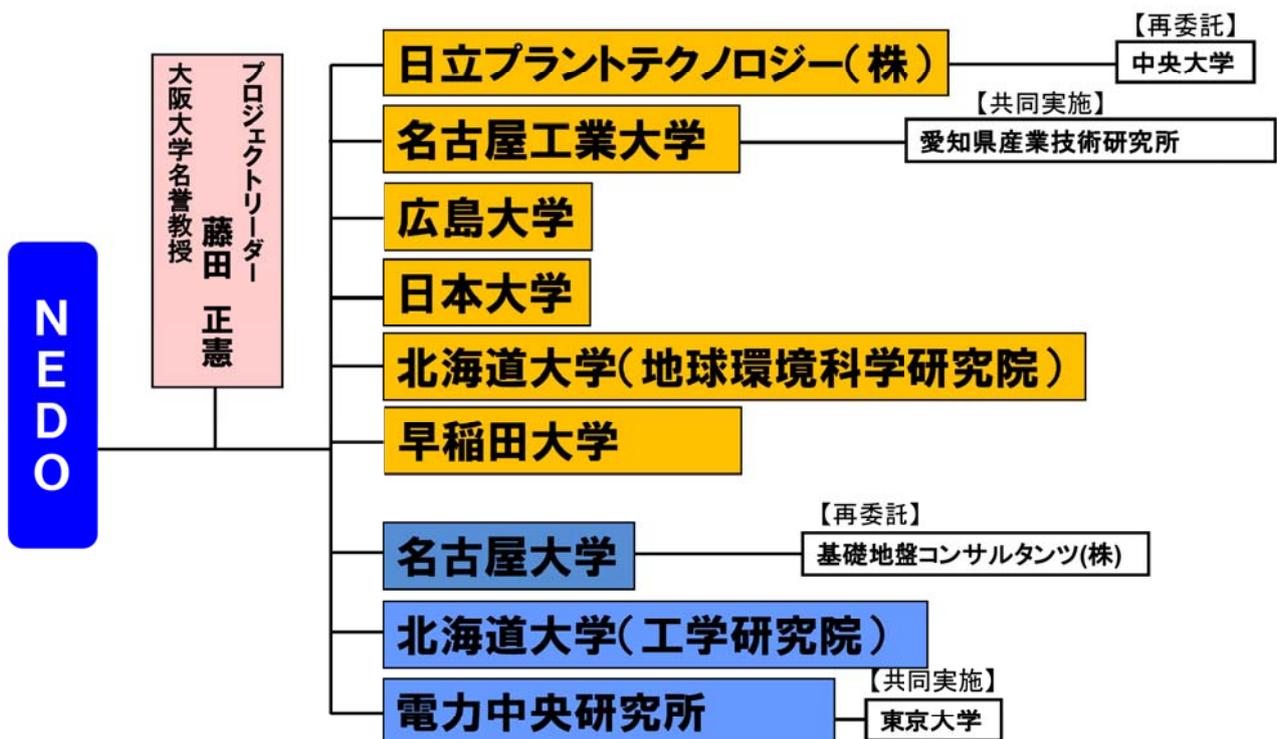
14/45

最終目標(嫌気性微生物処理)

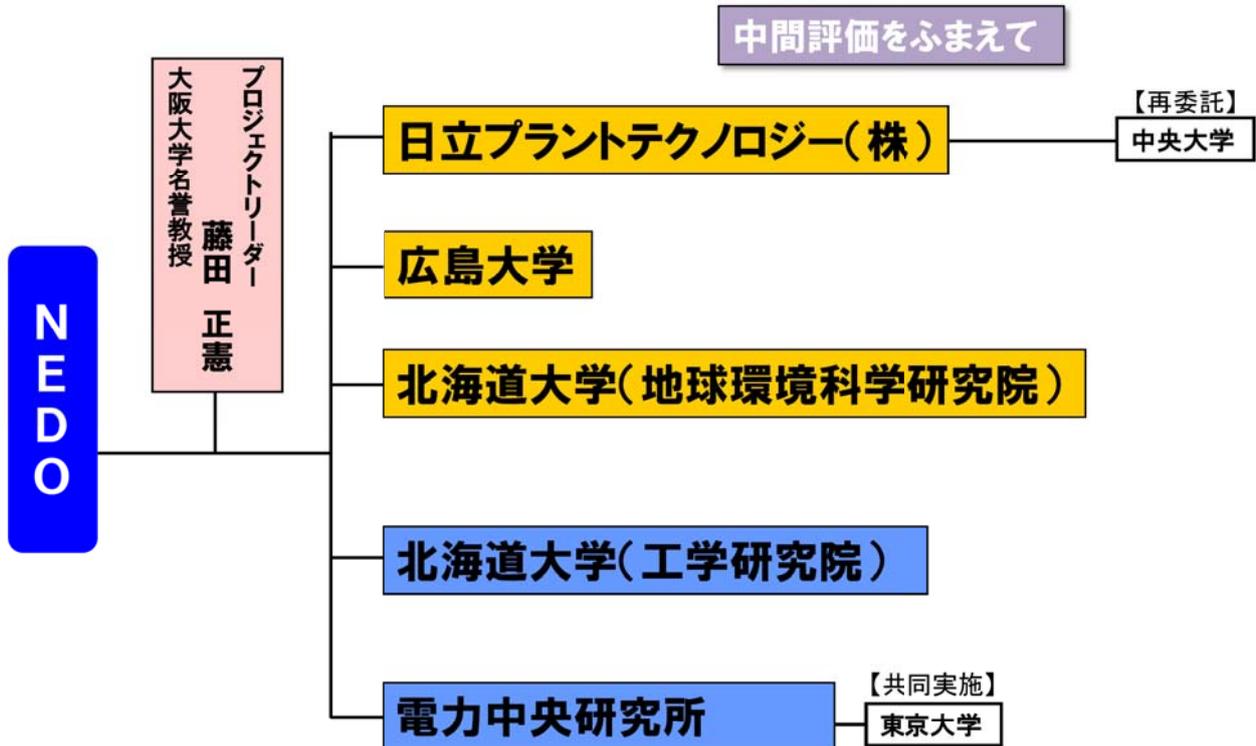
◎有用微生物群を人為的に空間配置させ
安定的に維持・優占化するための技術の
開発

- ・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の向上を実現
- ・従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機性廃棄物の種類への適用拡大

研究開発の実施体制(H.19-21年度)



研究開発の実施体制(H.22-23年度)



研究開発計画(内容・スケジュール・予算)

(単位:百万円)

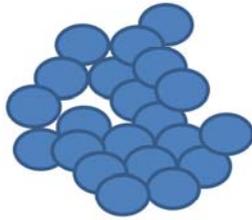
| 年度 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | |
|--------------------|------|------|------------------|------|------|------------------|--|
| 有用微生物群の選抜と特性評価 | | | | | | | |
| 有用微生物群の特性・機能評価 | → | | | | | | |
| 有用微生物群の安定的導入・維持 | | | 中 間 評 価 | | | 事 後 評 価 | |
| デザイン化技術の開発 | | | | | | | |
| 微生物群の処理機能の技術的有効性評価 | → | | | | | | |
| 微生物群の処理機能の技術的有効性評価 | | | | | | | |
| バイオエンジニアリング技術の開発 | | | | | | | |
| バイオエンジニアリング技術の開発 | | | | | | | |
| デザイン化微生物群の総合評価 | | | | | | | |
| デザイン化微生物群の総合評価 | | | | | | | |
| 開発予算 | 188 | 192 | 171 | 108 | 101 | 760 | |

上段は好気性、下段は嫌気性.

2012年度の欄は合計額

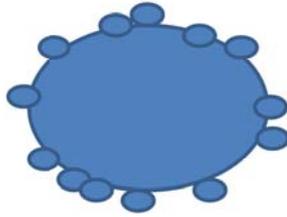
デザイン化技術例

公開



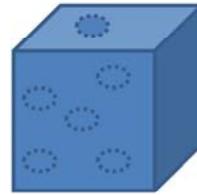
グラニュール

北大-工



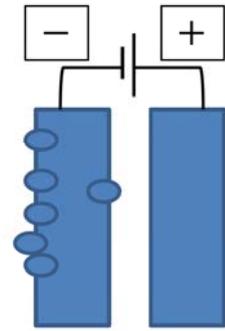
付着

広島大学 北大-地



包括固定化

日立PT

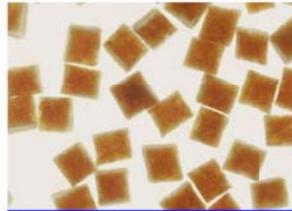


電気制御

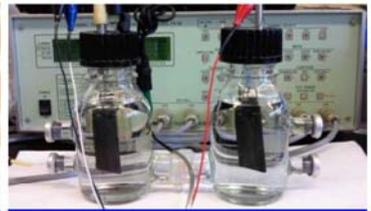
電力中央研究所



アナモックスグラニュール



包括固定化担体



通電型発酵槽

公開

研究開発内容

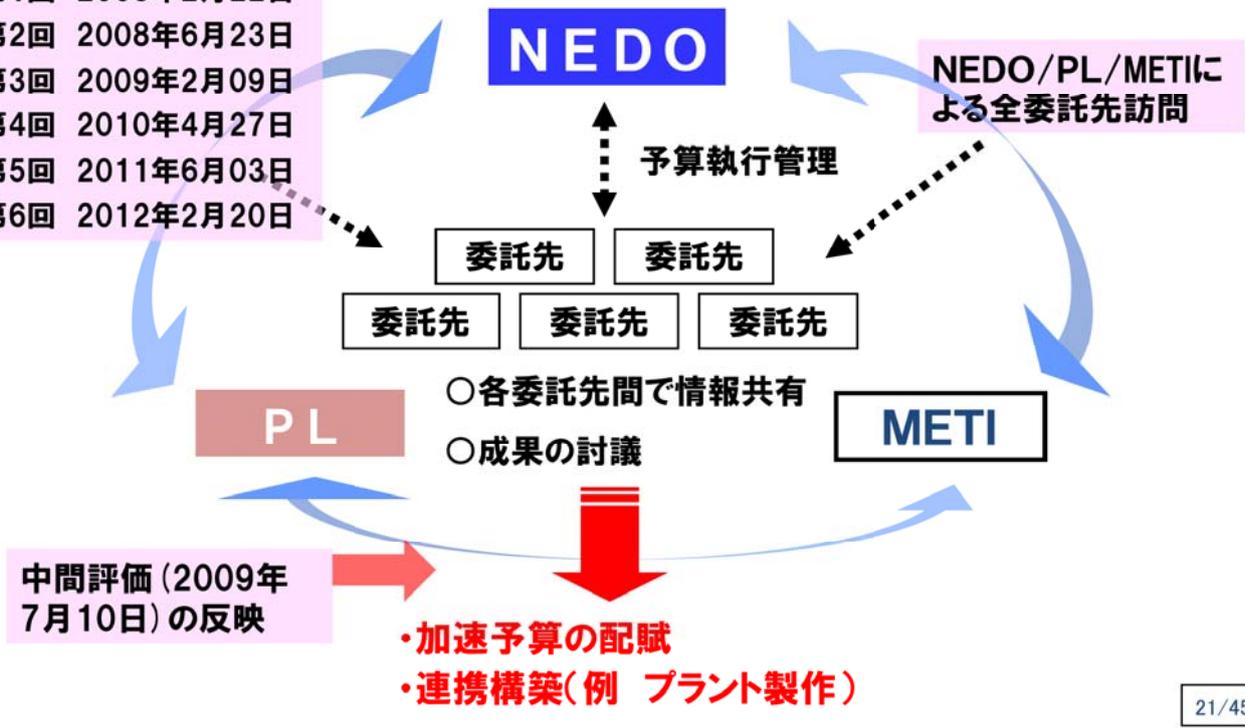
| | | | | | |
|------|----------------|------------|--------------|------------------|----------------|
| 日立PT | 好気性処理 | | | | |
| | 微生物(群)の選抜と特性評価 | 微生物群の安定的維持 | 微生物群の処理機能の評価 | バイオエンジニアリング技術の開発 | デザイン化微生物群の総合評価 |
| 広大 | | | | | |
| 北大-地 | | | | | |

| | | | | | |
|------|----------------|------------|--------------|------------------|----------------|
| 北大-工 | 嫌気性処理 | | | | |
| | 微生物(群)の特性と機能評価 | デザイン化技術の開発 | 微生物群の処理機能の評価 | バイオエンジニアリング技術の開発 | デザイン化微生物群の総合評価 |
| 電中研 | | | | | |

NEDOのマネジメント (1)

【研究開発委員会】

- 第1回 2008年2月22日
- 第2回 2008年6月23日
- 第3回 2009年2月09日
- 第4回 2010年4月27日
- 第5回 2011年6月03日
- 第6回 2012年2月20日



NEDOのマネジメント (2)

— 連携構築 —

仮想プラントの提案

日立PT、電中研、北大-工、北大-地、広大

— 微生物の寄託依頼 —

成果物としての微生物の寄託依頼

産業上有用な微生物をNITE (NBRC) への寄託を依頼

中間評価への対応(1)

公開

| 今後に対する提言 | 対 応 |
|--|---|
| <p>本プロジェクトに課せられた当初の2大最終目標に相応する研究課題ごとの目標を設定①し、その上で残された期間の研究開発を遂行し、実用化を含む成果に達することが望まれる。また、本プロジェクトの開発成果②が日本発のオリジナル技術として実を結び、問題を抱える新興国はもとより、開発公害途上国の下廃水・廃棄物処理等のインフラ整備にも貢献できるよう期待したい。</p> | <p>①本技術開発の大きな目標に沿って、実用化を目指す課題、基礎技術の開発を目指す課題、あるいは微生物デザイン化に資する学術的課題に適した具体的な目標を設定し、残り2年間で課題ごとに研究を集大成している。</p> <p>②まず、個々の課題の成果を重視しつつ、それが水処理分野でどのように貢献するかをミーティング等で議論し、一例として有機性廃棄物や下・排水等を対象とした「想定される省エネ・高効率型環境バイオ処理システム」として、実現可能なシステムを提案している。また、個々のバイオ処理システムあるいはそれらの総合化システムは、省エネ型かつ高効率型であることから、技術・価格の両面で国際競争力を備えていると自負しており、先進国のみならず新興国・開発途上国でも十分に採用されうる技術であり、インフラ整備等に貢献しうると考える。</p> |

23/45

中間評価への対応(2)

公開

| 今後に対する提言 | 対 応 |
|--|--|
| <p>本プロジェクトにおける有用微生物の探索の研究、装置の開発、制御の研究について、それぞれの知見を上手く組み合わせていくことが重要である。実用化を見据えて現実性のある組合せ③を優先し、研究開発を進めていって欲しい。また、微生物によるバイオ処理技術に関しては多くの知見や実績があり、他の技術との優位性④を明らかにしておく必要がある。</p> | <p>③中間評価の結果等から、9課題すべてを維持することが困難と判断され、選択と集中により主として有機性廃棄物および下・排水処理を対象としつつ、かつより実用化ならびに新規技術の開発につながるテーマに絞り、ラストパートをかけた。その結果、例えば「想定される省エネ・高効率型環境バイオ処理システム」につながり、また資源回収の視点からの低コストかつ省エネ・高効率焼回収システムのパイロット試験につながった。</p> <p>④省エネ・高効率の点で、これまでの技術を十分に超えており、バイオ処理における技術的・价格的な優位性は極めて高いと考えている。</p> |

24/45

中間評価への対応(3)

公開

| 今後に対する提言 | 対応 |
|---|--|
| 本プロジェクトの終了時には、微生物群の機能が依然として ブラックボックス⑤ のままであってはならず、物質分解やバイオガス化の著しい高速化の理由等を十分に説明することが望まれる。 | ⑤完全に微生物群の機能を解明したとは言えないが、5年前に比べ、例えばアンモニア酸化では硝酸化を抑制すること、即ち亜硝酸酸化細菌とアンモニア酸化細菌の個別制御が困難であったのが、本プロジェクトでは実用レベルでアンモニア酸化細菌が優先な微生物群を作り上げ、亜硝酸型アンモニア酸化が可能になったことは学術的、技術的に進歩したと考えている。その他、バイオフィルム工学の発展による新たな微生物共生系の構築、アナモックス細菌のメタゲノム解析からの新知見による速度向上の可能性など、本プロジェクトでの成果は微生物群の制御に学術的にも貢献したと考える。 |

25/45

公開

追加的資金(加速資金)配分

| 実施者 | 時期 | 金額 (百万円) | 内容 | 結果 |
|------|--------|-------------|------------------------------|--|
| 日立PT | 平成21年度 | 42 | 亜硝酸硝化プロセスの試験プラント作製 | 幅広いアンモニア濃度の流入水を対象として、亜硝酸型硝化反応の長期安定処理性能を評価。低濃度アンモニア廃水(NH ₄ -N80mg/L)の長期亜硝酸型硝化に世界で初めて成功 |
| 電中研 | 平成21年度 | 7 | 固定床メタン発酵に及ぼす阻害物質の影響評価の加速 | 実廃棄物処理時に生じるアンモニアが固定床メタン発酵に及ぼす影響を明らかにすることができた |
| 北大-地 | 平成21年度 | 3 | バイオフィルム工学による活性汚泥法の効率化・安定化の加速 | 目標であるバイオフィルム工学によるアンモニア酸化細菌の活性促進ならびにその分子機構の解明に成功した |
| 北大-工 | 平成21年度 | 4 | アナモックスリアクター作製 | 実廃水をアナモックスプロセスで処理することができ、高い窒素除去速度(6.0 kg-T N m ⁻³ day ⁻¹)を達成した |
| 広大 | 平成22年度 | 35 | DHSリアクタープラント作製 | 実下水を用いて実用化に向けた検討を行うことができた |

上記以外に、中間評価時まで、日立PT、北大(工)へ加速資金を配分

26/45

- I 事業の位置付け・必要性
 - II 研究開発マネジメント
 - III 成果
 - IV 実用化の見通し
- } NEDO(長谷川)
- } 藤田PL

3. 研究開発成果について (1)最終目標の達成度

目標の達成度 好気性処理

| | 従来 | 最終目標 | 成果 | 達成度 |
|-------------------------|--|--|--|-----|
| 亜硝酸硝化 (日立PT) | ・曝気された酸素の25%を 亜硝酸酸化が消費 (BOD/N比1未満) | 亜硝酸型硝化により、通 常の硝化工程に必要な 酸素消費量25%を削減 | ・消化脱水ろ液(NH ₄ -N 1,000mg/L) の亜硝酸型硝化に成功 ・同希釈液(NH ₄ -N 80mg/L)のpH ショック法による亜硝酸型硝化に成功 (酸素消費量25%削減) ・亜酸化窒素発生抑制に成功 | ◎ |
| バイオフィルム 工学 (北大-地) | 無し | バイオフィルム工学による 活性汚泥法の効率化・安 定化 | アンモニア酸化細菌 <i>Nitrosomonas europaea</i> の活性を2.5倍向上させる バイオフィルムの形成に成功し、 その原因を遺伝子レベルで特定す ることに成功 <i>N. europaea</i> を活性化する新規細菌 を発見した。Anammox細菌につい て、主要膜タンパク質を同定 | ○ |
| DHSリアクター (広大) | ・活性汚泥法+従来法 リン回収コスト | ・DHSリアクターを用いた リン濃縮技術の開発 | ・DHSリアクターによる人工排水中のリン 濃縮(32倍に濃縮) | ○ |

達成度:◎は大幅に達成、○は達成を示す。

目標の達成度 嫌気性処理

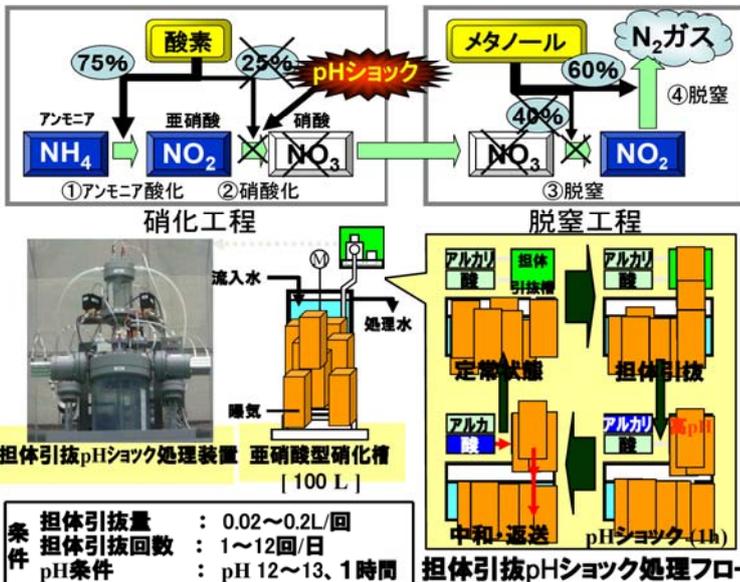
| | 従来 | 最終目標 | 成果 | 達成度 |
|----------------------------|---|--------------------------|---|-----|
| 微生物群集の電気制御 (電中研) | 日平均容積効率 (有機物負荷量): 8.5 kgCOD/m ³ /日 | 従来の設備を50%にコンパクト化 | 模擬廃棄物で最大有機物負荷量 89.3 kgCOD/m ³ /日 (約21%にコンパクト化) | ◎ |
| ANAMMOXプロセスの最適条件の検討 (北大-工) | 従来の硝化脱窒 1-2 kg-N/m ³ /day | 高効率の部分硝化- Anammoxプロセスの開発 | 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 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 | ◎ |

達成度: ◎は大幅に達成、○は達成を示す。

成果の概要 (日立PT)

曝気量とメタノール添加量の削減需要が見込まれる消化汚泥脱水ろ液、産業排水処理に向けて、硝酸化抑制技術を用いた窒素除去システムを開発。

- 技術の特長
- (1) アルカリ溶液への担体浸漬(pHショック)で硝酸生成を抑制
 - (2) アナモックスの前処理としても利用可能



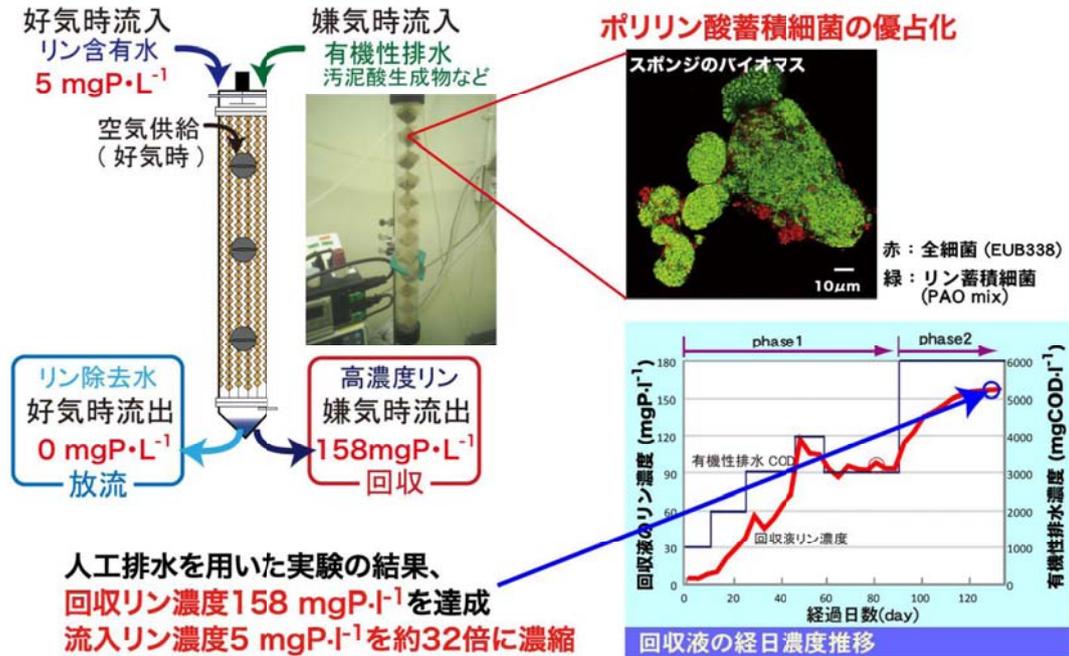
効果

- 亜硝酸型硝化で 曝気量25%削減
- 適用アンモニア濃度範囲拡大 (NH₄-N 80~1,000mg/L)
- アナモックス処理の前段として利用可能
- GHG(亜酸化窒素)の発生抑制可能に

成果の概要(広大)

公開

密閉型DHSによる新規なリン回収(特願2009-044797)



余剰汚泥レス排水処理システムからのリン回収

31/45

成果の概要(北大-地)

公開

【成果1】アンモニア酸化細菌群のデザイン化

AOB をバイオフィーム化し、活性汚泥細菌 (*Rheinheimera* 属) を共存させること(微生物群デザイン化)によって、アンモニア処理活性を2~3倍程度上昇させることに成功した。

【成果2】原油汚染土壌浄化細菌のデザイン化

ナフタレン分解細菌をバイオフィーム化することで分解持続性を大幅に拡大(効率化)することに成功した。

【成果3】植物-根圏細菌群のデザイン化

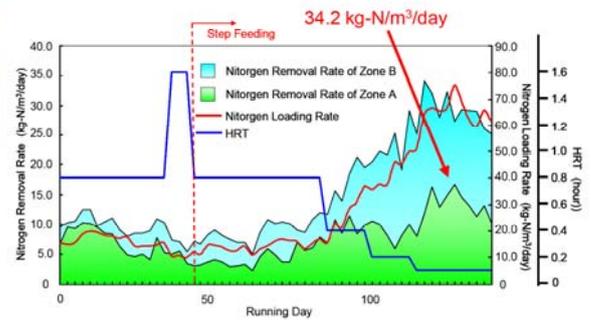
根圏バイオフィーム工学により、持続的水質浄化と植物の生育促進を同時に実現することに成功した。(世界初!)

Acinetobacter calcoaceticus P23

成果の概要(北大-工①) 公開

| 研究項目 | 成果概要 |
|----------------------------------|--|
| 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この時のANAMMOXリアクターの最大窒素除去速度15.0 Kg-TN/m ³ /dを達成した |
| 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 |
| 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ー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 |

高効率部分硝化-
Anammoxリアクター
の開発

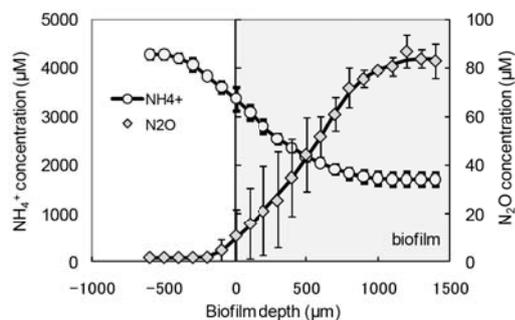
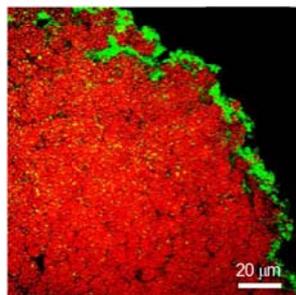


事業原簿Ⅲ-2-4.
33/45

成果の概要(北大-工②) 公開

| 研究項目 | 成果概要 |
|--------------------------------|---|
| 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 |
| ⑤ANAMMOX細菌のメタゲノム解析 | ⑤Ca. B. sinicaの完全長に近いゲノム配列の再構築に成功した。プロテオーム解析を行い、新規窒素代謝経路を発見 |
| ⑥実廃水を用いた実証試験 (Anammoxプロセスのみ) | ⑥消化汚泥脱離液をAnammoxプロセスで処理した。窒素除去速度約6.0 kg-TN m ⁻³ day ⁻¹ を達成 |

Anammoxグラニュールの
微生物群集構造とin situ
N₂O濃度プロファイル



事業原簿Ⅲ-2-4.
34/45

成果の概要(電中研①)

公開

生ごみなど固形有機廃棄物のメタン発酵処理

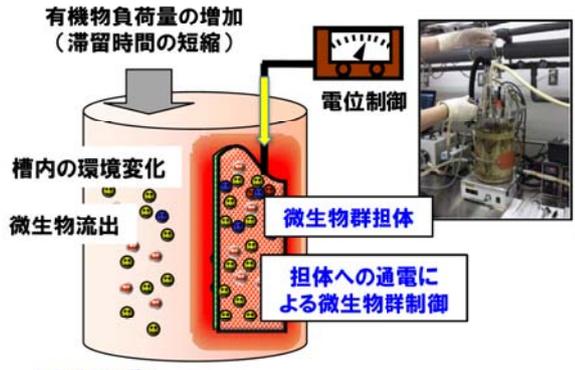
電力中央研究所 共同実施先: 東京大学

技術開発
 ・担体の効果
 ・発酵槽内の通電の効果
 ・担体と通電制御の組合せによる効果

高い有機物負荷量での安定化
 (短い水理学的滞留時間)

発酵槽
 効率化・コンパクト化

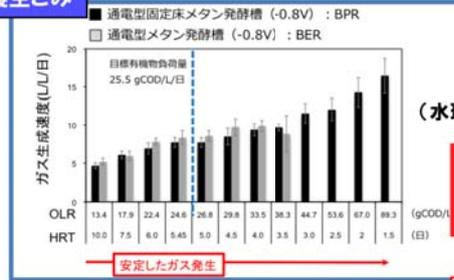
通電型固定床メタン発酵槽の開発



デザイン化
 微生物群集+担体+通電による制御

通電型固定床メタン発酵槽 事業原簿Ⅲ-2-5.

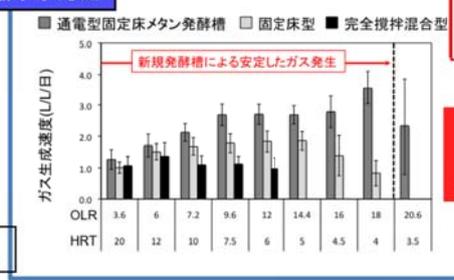
模擬生ごみ



最大負荷量:
 89.3gCOD/L/日
 (水理学的滞留時間1.5日)

目標負荷量以上で
 (25.5gCOD/L/日)
 安定処理

濃縮下水汚泥



既設設備
 3倍以上の効
 率化を達成

既設設備に対して
 負荷量約4.5倍
 約36%にコンパクト化

35/45

成果の概要(電中研②)

公開



通電型メタン発酵槽

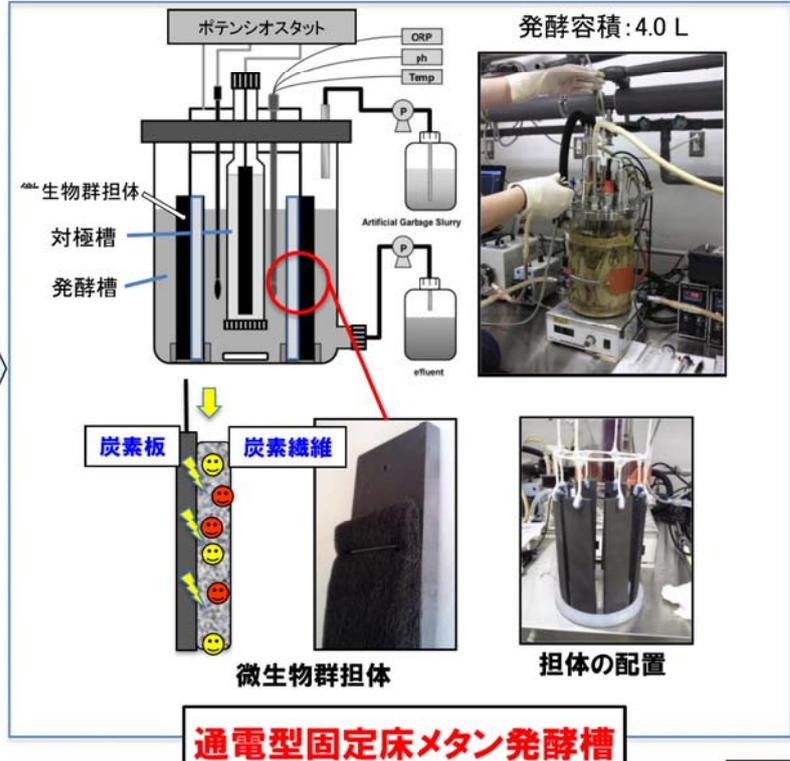
+



微生物群担体
 (炭素繊維)
 (PE繊維)

固定床メタン発酵槽

事業原簿Ⅲ-2-5.



通電型固定床メタン発酵槽

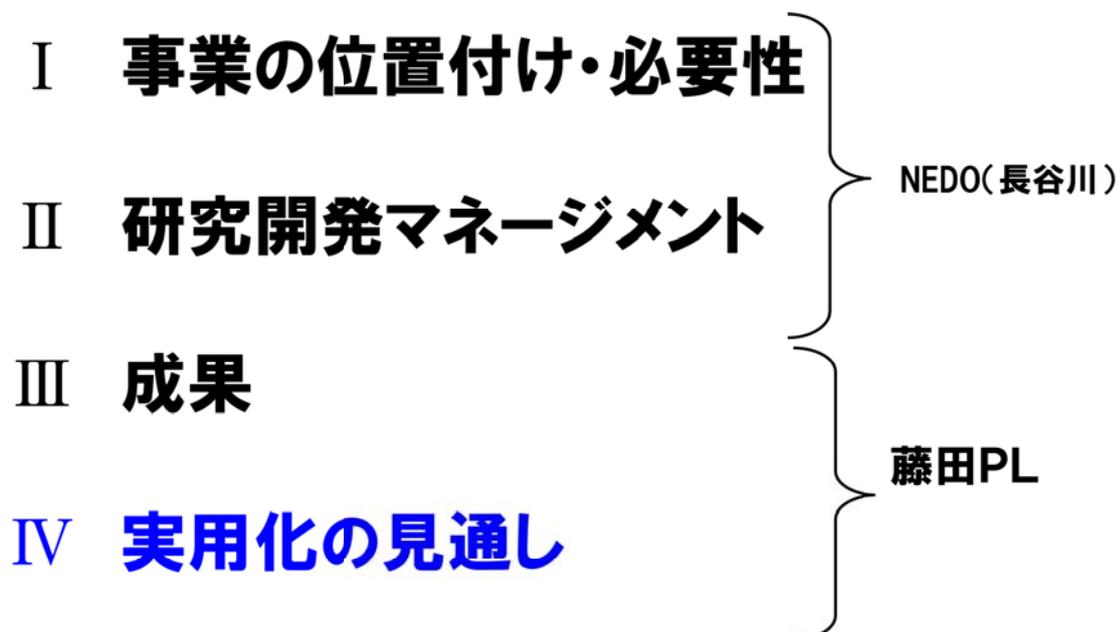
36/45

(3) 知的財産権、成果の普及

| | 特許出願 | 新聞・雑誌等掲載 | 受賞実績 | 口頭発表 | 論文発表 | | 合計 |
|------|------|----------|------|------|------|-----|-----|
| | 国内出願 | | | | 査読付き | その他 | |
| 電中研 | 5 | 3 | | 9 | 8 | 1 | 26 |
| 北大工 | | | 7 | 26 | 6 | 1 | 40 |
| 北大地 | 1 | | 1 | 71 | 18 | 7 | 98 |
| 広島大学 | 1 | | 1 | 34 | 4 | 1 | 41 |
| 日立PT | | | | 8 | 1 | | 9 |
| 合計 | 7 | 3 | 9 | 148 | 37 | 10 | 214 |

37/45

発表内容



38/45

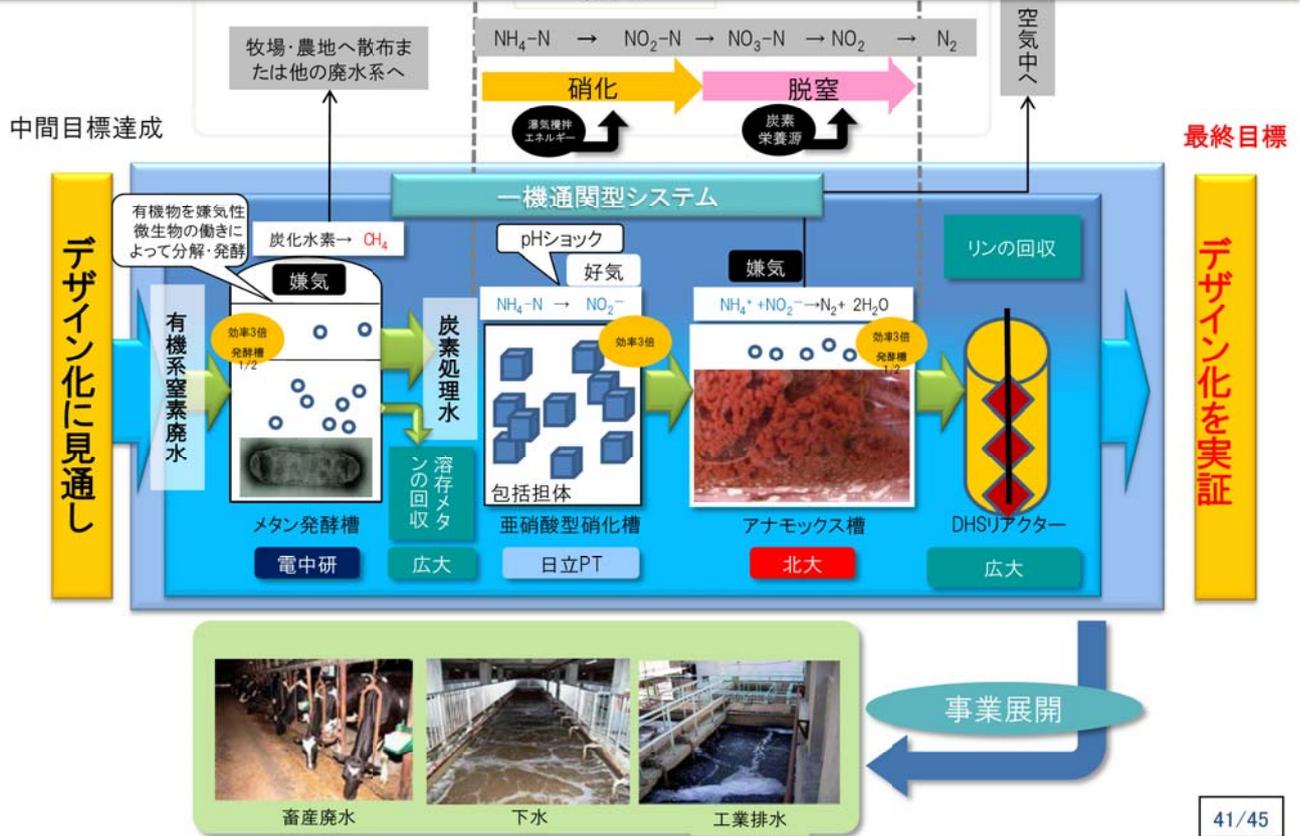
実用化イメージ(好気性処理)

| 実施者 | キーテクノロジー | 対象物 |
|-------|-----------------|--|
| 日立PT | 包括固定化担体、pHショック法 | 高濃度アンモニア廃水(下水処理施設:消化脱水ろ液、産業廃水処理施設、畜産廃水処理施設)に適用 |
| 広大 | 高濃度微生物保持技術 | 下・排水処理における温室効果ガス防止、リン資源回収 |
| 北大(地) | バイオフィルム工学 | 硝化・脱窒法およびANAMMOX法水処理技術、バイオレメディエーション技術 |

実用化イメージ(嫌気性処理)

| 実施者 | キーテクノロジー | 対象物 |
|-------|---------------|-------------------------------------|
| 北大(工) | 窒素除去ANAMMOX反応 | 半導体製造工程廃水、メタン発酵脱離液や製鉄所廃水などからの窒素除去 |
| 電中研 | 微生物群集の電気制御技術 | 高効率メタン発酵槽による未利用廃棄物(食品廃棄物、下水汚泥など)の処理 |

想定される実用化イメージ



プロジェクト開発技術の海外に対する優位性 (1)

| | 世界の技術レベル・開発動向 | 本プロジェクトの優位性 |
|------|--|--|
| 日立PT | <p>現在、亜硝酸型硝化プロセスの普及は、広がりつつあるアナモックスプロセスの前段プロセスとして注目され、オランダを中心に広がりを見せており、ドイツ、オーストリア、スイスにおいて適用の報告がなされている。最近の動向では中国においてCANONの大型設備が建設中である。また、2009年からアメリカ、ニューヨーク市において、汚泥脱水ろ液を対象に亜硝酸型硝化プロセスと脱窒プロセスを組み合わせた処理が行われている。</p> | <p>本研究開発技術の特徴は、i)硝化細菌をゲル中に包括固定化した担体を用い、ii) pHショック法によるNOB活性を抑制することにある。本技術はNOB活性抑制のために溶存酸素濃度を下げる必要が無いため、AOB活性を十分に活性化させることが可能となる。従って、処理時間の短縮が図れるため、反応槽容積が小さくなる優位性がある。また、既存の海外技術は処理対象が高濃度アンモニア廃水のみであるのに対し、本研究開発技術は廃水のアンモニア濃度が$\text{NH}_4\text{-N} \geq 80\text{mg/L}$と低い濃度も対象となることから、消化汚泥脱水ろ液以外の比較的濃度の低い産業廃水等への展開が期待できるのと同時に、流入負荷変動による反応槽内遊離アンモニア濃度の急激な減少に伴う硝酸生成活性化の懸念が無いことが大きな優位性となる。また、亜硝酸型硝化反応は地球温暖化ガスである亜酸化窒素が大量に発生すると言われており、pHショック法を適用することによりこれを抑制することが可能な本技術は、海外技術に対して高い優位性を有する。</p> |

プロジェクト開発技術の海外に対する優位性 (2)

| | 世界の技術レベル・開発動向 | 本プロジェクトの優位性 |
|------|--|--|
| 広大 | <p>下水等の処理水に残存している低濃度のリン酸を凝集剤を用い化学的に除去し、回収する方法は提案されているが、化学的な除去・回収はコスト面等の問題から下水処理水に対しては実用化されておらず、この解決には、低コストの微生物を利用した生物学的な方法が考えられる。</p> <p>しかし、海外において生物学的リン除去・回収の必要性を感じつつも、名案がない状況である。ポリリン酸蓄積細菌を活用して、低濃度のリン酸を除去し高濃度の液として回収しようとする本研究以外に、国内外において生物学的リン除去・回収方法は現在のところ存在しない。</p> | <p>海外では、下水処理水からの生物学的リン除去・回収方法がない状況であり、本研究で開発している技術は、我が国から発信する数少ない水環境技術であり、日本の主導による全世界の水環境保全への貢献が図れる。</p> |
| 北大-地 | <p>①アンモニア酸化細菌を取り巻く微生物群集を一からデザイン化する試みは1996年の電力中央研究所によるものがほぼ唯一例で、それ以外は活性汚泥をそのまま固定する方法</p> | <p>①アンモニア酸化細菌と共生する細菌に関する報告例はあるが、本研究課題で見つけた Rheinheimera 属細菌は全く新しい発見で、その作用機構はまだ完全には判っていないが、後者の代謝産物がアンモニア酸化細菌を活性化している可能性が示唆された</p> |

43/45

プロジェクト開発技術の海外に対する優位性 (3)

| | 世界の技術レベル・開発動向 | 本プロジェクトの優位性 |
|------|---|--|
| 北大-工 | <p>部分硝化-anammoxプロセスに関しては、やはりオランダのPaques社により、既の実規模の処理プラントが世界各地で合計16基が建設運転されている。</p> <p>注目すべきは、2010年以降9基が建設されている点である。今後はプラントの建設が加速されると見込まれる。特に中国における建設が増加すると思われる。</p> | <p>国際展開に関しては、出遅れていると言わざるを得ないが、我々の所有するanammox細菌は、オランダPaques社の所有する細菌種とは系統的に異なり、その点において彼らの有する特許から逃れられると考えられる。さらに、我々のanammox細菌は、Paques社の保有する菌株と比較して、増殖速度が速くスタートアップに有利であること、anammox活性が高く、高付加の窒素負荷に対応可能であること、などが利点としてあげられる。</p> <p>本プロジェクトで得られた窒素除去速度はこれまでに報告されている速度よりも高く、実用化により適していると考えられる。</p> |
| 電中研 | <p>①液体を主体とする高濃度の有機物廃棄物(廃水)では、UASBなどによる効率的なメタン発酵処理</p> <p>②下水汚泥、生ゴミなど固形廃棄物を含む廃棄物のメタン発酵では、水理学的滞留時間で中温20~30日、高温10日~15日が一般的な処理レベル</p> <p>③廃棄物(排水)の微生物処理と電気の関わりとして微生物燃料電池の研究</p> | <p>①微生物群担体と担体への電気による微生物制御技術を組み合わせた独自の技術</p> <p>②生ゴミなど固形廃棄物に適用したメタン発酵で世界最高レベルの負荷運転による効率を達成</p> <p>③下水汚泥処理において高いレベルの容積当たりの効率を達成</p> |

44/45

波及効果



微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発
微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発
有用微生物群による高効率好気水処理技術の研究開発
平成19年度～平成23年度(公開版)



平成24年4月19日

委託先(株)日立プラントテクノロジー
再委託先中央大学

事業原簿 Ⅲ-2-1

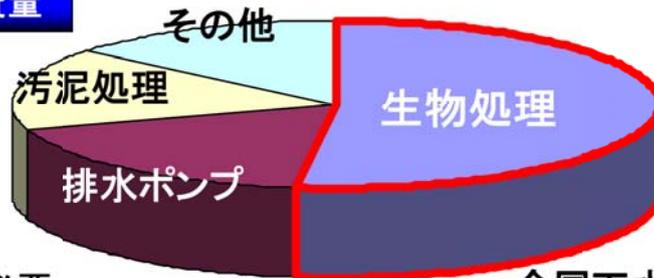
1/37

好気

開発背景(H19-21年度)

公開

処理場での電力消費量

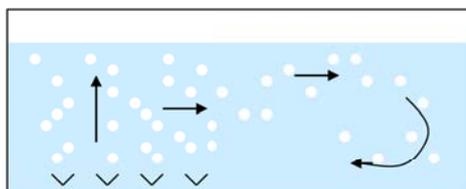


曝気動力の低減が必要

全国下水処理場での
電力総消費量 47.5億kwh/年

従来の曝気量低減技術開発

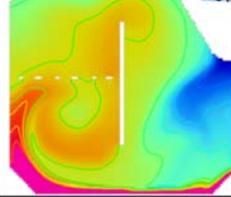
散気装置などの最適配置の解析
酸素溶解効率の向上
気泡上昇速度の低減→KLaアップ



水、気泡、担体の3相流動解析

担体比重
1.035

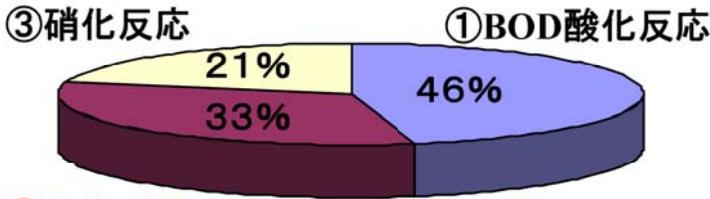
担体濃度
15%
75%
0%



事業原簿 Ⅲ-2-1

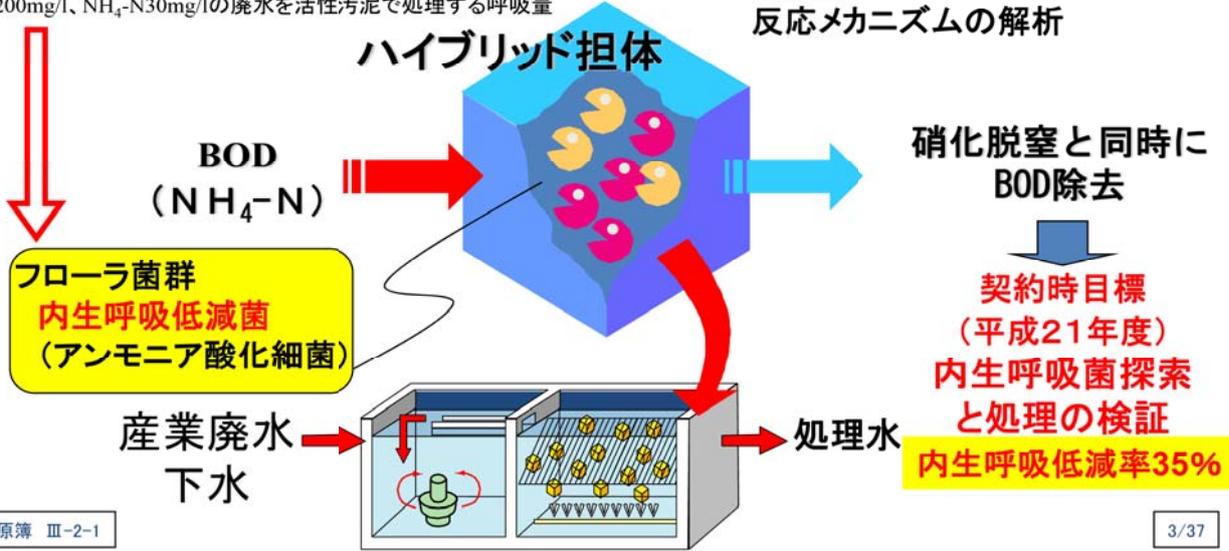
2/37

活性汚泥の呼吸量(必要酸素量)

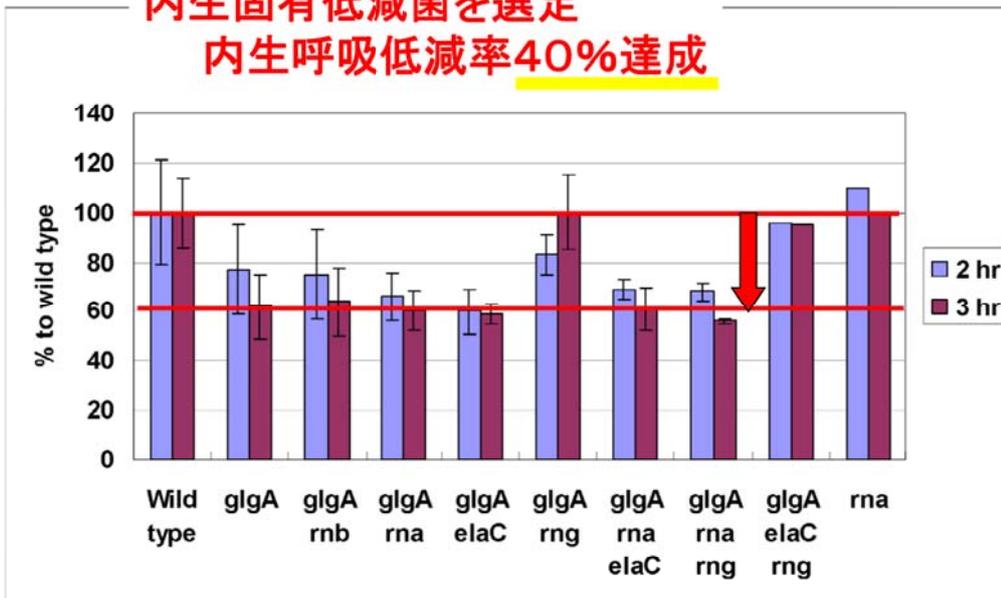


② 内生呼吸反応

BOD200mg/l、NH₄-N30mg/lの廃水を活性汚泥で処理する呼吸量



内生固有低減菌を選定 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

遺伝子組換え菌(グリコーゲン合成欠損)では内生呼吸が低減されることを確認

自然界から内生呼吸低減菌は得られるか?

活性汚泥構成菌の内生呼吸を解析

| 試料名称 | MLSS | 分離源 |
|------|--------------|--------------------|
| CH | aplx. 10,000 | 千葉N下水処理場返送汚泥 |
| PE | aplx. 2,000 | 千葉M厨房排水処理場汚泥 |
| HS | aplx. 50 | 加熱処理担体(亜硝酸型硝化担体) |
| PA | aplx. 50 | アルカリ処理担体(亜硝酸型硝化担体) |

- 一般排水処理施設二箇所より活性汚泥を採集、従属栄養細菌を分離。
- これとは別に、亜硝酸型硝化担体に集積された従属栄養細菌を分離。
- これらのサンプルを生理食塩水にけん濁・希釈後、1/5濃度のLB Agar(貧栄養寒天培地)に塗布、25°Cで培養。
- コロニー形態がなるべく異なるものを選び、全部で200株を分離。
- 16S rRNA遺伝子部分配列決定。
- 分離源が同じで、16S rRNA遺伝子配列が同じかつコロニー形態が類似なものを排除。33株を保存。(HSについては類似のもの6株を保存。)
- 炭素源の資化性および資化関連酵素活性を調査。
- 内生・外生呼吸率を測定。

分離した細菌の外生呼吸(r_1)と内生呼吸(r_2)

| Source | Genus species | r_1 | r_2 | Ratio |
|--------|--|-------|-------|-------|
| Human | <i>Escherichia coli</i> (strain K-12) | 394.5 | 9.8 | 40.3 |
| HS | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (strain E3) | 281.5 | 9.9 | 28.4 |
| CH | <i>Enterobacter</i> sp. (strain B5) | 413.0 | 15.7 | 26.4 |
| PE | <i>Comamonas</i> sp. (strain D2) | 205.5 | 7.9 | 26.2 |
| PA | <i>Achromobacter</i> sp. (strain E7) | 325.5 | 13.1 | 24.9 |
| PA | <i>Arthrobacter</i> sp. (strain B4) | 294.0 | 14.4 | 20.4 |
| HS | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (strain E1) | 293.0 | 15.2 | 19.3 |
| PE | <i>Comamonas</i> sp.(strain D2) | 323.5 | 20.7 | 15.7 |
| CH | <i>Pantoea agglomerans</i> (strain A5) | 176.0 | 11.9 | 14.8 |
| PE | <i>Stenotrophomonas</i> (strain D3) | 278.0 | 19.4 | 14.4 |
| PE | <i>Acinetobacter</i> sp.(strain F6) | 341.5 | 27.6 | 12.4 |
| HS | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (strain E2) | 382.0 | 37.9 | 10.1 |
| PE | <i>Paracoccus</i> sp.(strain D4) | 271.0 | 28.0 | 9.7 |
| PE | <i>Pseudomonas syringae</i> (strain D1) | 304.5 | 45.6 | 6.7 |
| PA | <i>Brevundimonas vesicularis</i> (strain B2) | 213.0 | 33.5 | 6.4 |
| PA | <i>Brevundimonas vesicularis</i> (strain B1) | 186.0 | 32.9 | 5.7 |
| CH | <i>Sphingopyxis</i> sp. (strain F2) | 135.0 | 37.6 | 3.6 |
| CH | <i>Bacillus cereus</i> (strain A3) | 251.0 | 76.9 | 3.3 |
| CH | <i>Bacillus</i> sp. (strain A4) | 131.0 | 53.0 | 2.5 |
| CH | <i>Bacillus cereus</i> (strain A2) | 119.5 | 49.4 | 2.4 |
| PE | <i>Bacillus subtilis</i> (strain A1) | 27.5 | 11.8 | 2.3 |

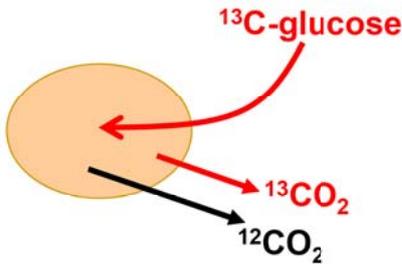
<以上の実験での定義>

内生呼吸速度＝基質が存在しない時の呼吸速度

外生呼吸速度＝基質が存在する時の呼吸速度－内生呼吸速度

しかし、上記の方法では、基質の有無に関わらず内生呼吸速度が一定と仮定。よって、基質が存在する時の内生呼吸速度を以下の方法で測定。

内生呼吸と外生呼吸の比



| | r_1/r_2 | |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | by oxygen electrode | by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ |
| <i>Escherichia coli</i> K-12 | 40.3 | 7.4 |
| <i>Enterobacter</i> sp. strain B5 | 26.4 | 13.2 |
| <i>Bacillus</i> sp. strain A4 | 2.5 | 0.5 |

傾向は同じだが、値は微妙に異なる。

酸素制限条件でのグルコースの分解

酸素消費効率＝基質分解に用いられた酸素量／全酸素消費量

| | Initial oxygen concentration (μM) | | |
|-----------------------------------|--|-------|-------|
| | 220 | 320 | 420 |
| <i>Escherichia coli</i> K-12 | 0.89 | 0.89 | 0.89 |
| <i>Enterobacter</i> sp. strain B5 | 0.63 | 0.68 | 0.67 |
| <i>Bacillus</i> sp. strain A4 | 0.072 | 0.089 | 0.138 |

内生呼吸低減菌は、酸素が制限された条件下で、基質分解に有利であることが実験的に証明された。

APIを用いた資化性検定

| Substrate | <i>Bacillus subtilis</i> A1 | <i>Bacillus cereus</i> A2 | <i>Brevundimonas</i> sp. B1 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> E1 | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> E2 |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glycerol | 1 | 0.5 | 0 | 1 | 0 |
| L-arabinose | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Ribose | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| D-xylose | 0.5 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| Galactose | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| D-glucose | 1 | 1 | 0 | 1 | 0.5 |
| D-fructose | 1 | 0.5 | 0 | 1 | 0.5 |
| D-mannose | 1 | 0 | 0 | 1 | 0.5 |
| Rhamnose | 0 | 0 | 0.5 | 0 | 0 |
| Inositol | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Manitol | 1 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| Sorbitol | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| α -methyl-D-mannoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| α -methyl-D-glucoside | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| N-acetyl glucosamine | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Amygdalin | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.5 |
| Esculin | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Salicin | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Cellobiose | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Maltose | 1 | 1 | 0.5 | 1 | 1 |
| Lactose | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.5 |
| Melibiose | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Sucrose | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Trehalose | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Inulin | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Melezitose | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| D-raffinose | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| Starch | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Glycogen | 0 | 0.5 | 0 | 1 | 0 |
| Xylitol | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| β -gentiobiose | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.5 |
| D-turanose | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0 |
| Score | 14.5 | 8.5 | 2 | 20.5 | 5 |

事業原簿 Ⅲ-2-1

0 : 資化せず、0.5 : 弱い資化、1 : 資化

9/37

資化性ベスト8

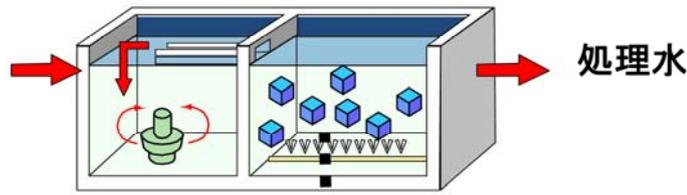
| | |
|---|------|
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E10 | 38.5 |
| <i>Enterobacter</i> sp. strain B5 | 37 |
| <i>Pantoea agglomerans</i> strain A5 | 33.5 |
| <i>Bacillus subtilis</i> strain A10 | 25.5 |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E1 | 23.5 |
| <i>Escherichia coli</i> K-12 | 23 |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain E2 | 21 |
| <i>Arthrobacter protophormiae</i> strain B4 | 20 |

事業原簿 Ⅲ-2-1

10/37

課題

BOD、N、P
産業廃水
下水

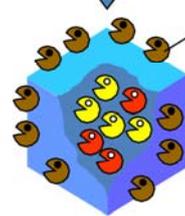


微生物群デザイン化担体
目的: 酸素要求量の低減化

(内生呼吸低減菌
など)

酸素要求量の高い
雑多な微生物

付着・増殖



担体表面への目的外微生物の
コンタミネーション

→ 酸素要求量の増加

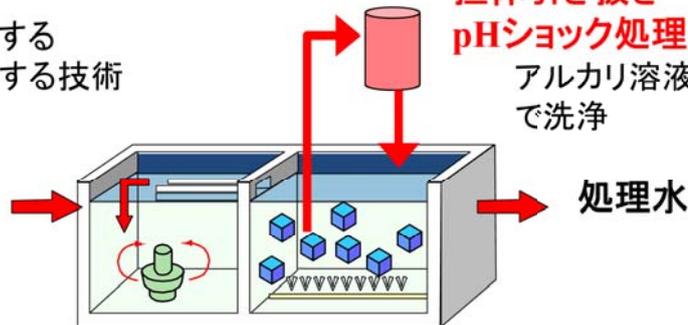
コンタミ防止システムが必要

対策

pHショック法:

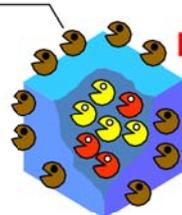
流入廃水等から混入する
雑多なコンタミ菌を排除する技術

BOD、N、P
産業廃水
下水



担体引き抜き
pHショック処理装置
アルカリ溶液(pH12~14)
で洗浄

担体表面への目的外
微生物のコンタミ



pHショック処理



内生呼吸低減菌

pHショック処理(pH13, 1時間)後の再増殖能を評価

内生呼吸低減菌(単離株)

Stenotrophomonas rhizophila E1株

Arthrobacter sp. B4株

Achromobacter sp. E7株

アルカリ処理後の各担体を中和し
滅菌済みナイフで分割後,
滅菌済みLB培地内で培養



図 再増殖した*Arthrobacter* sp. B4株

実廃水処理での内生呼吸低減菌の保持が可能

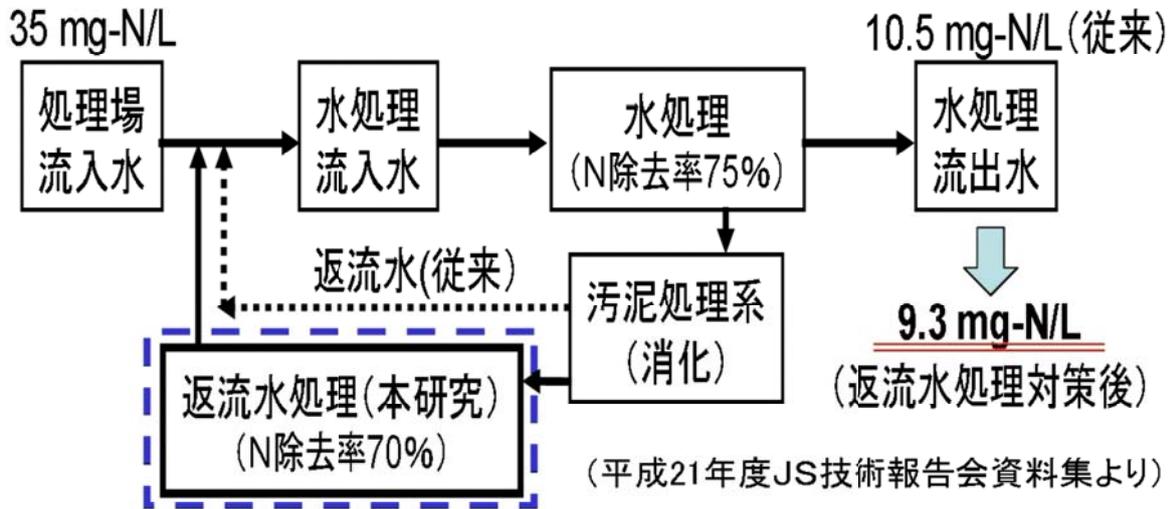
中間目標(基本計画の値)の達成度

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

| | プロセス | 曝気量 | 開発課題 |
|---------------------|------|-----|--------------------------|
| 従来技術 活性汚泥法 | | 100 | — |
| NEDO 新技術 中間成果 | | 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 実装置化 |

処理対象

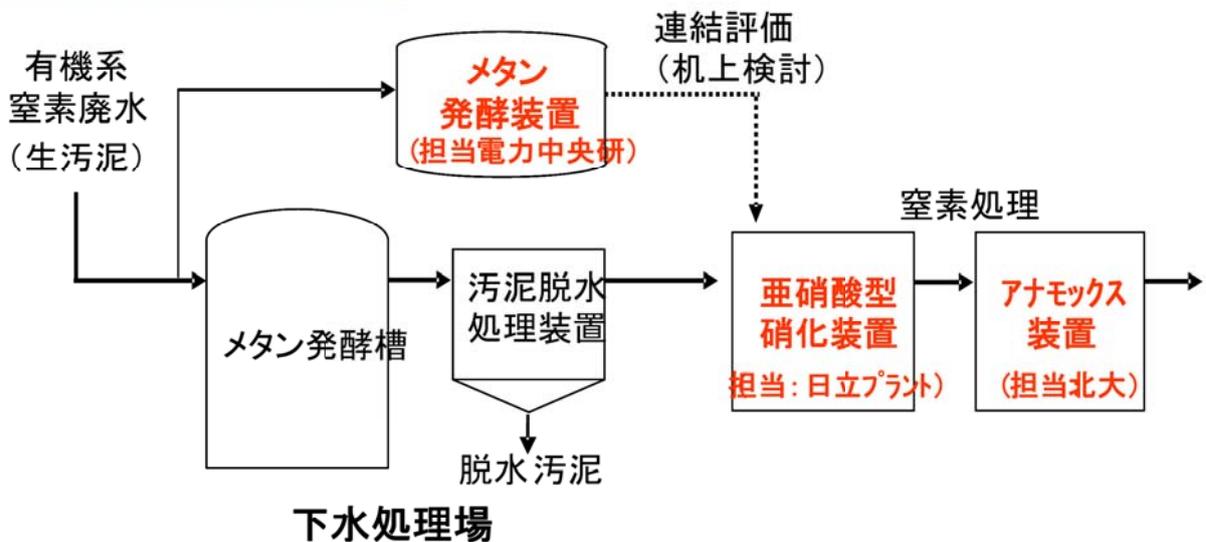
下水処理水の窒素を約10%低減



返流水(污泥脱水ろ液)処理による負荷削減効果の試算例

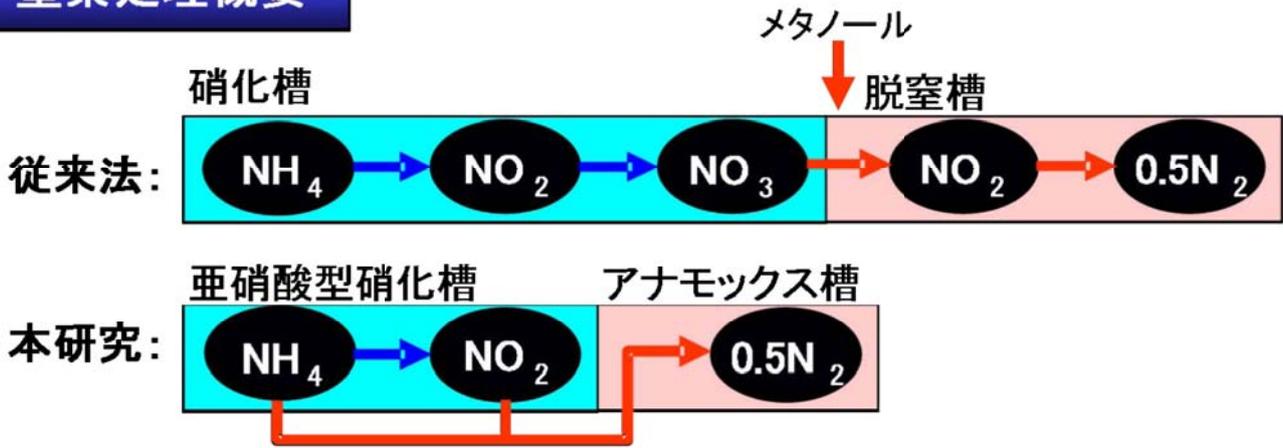
目標値: 従来法(硝化・脱窒)に比べ消費エネルギー量を1/3以下とする

実証プラントの概要



有機性窒素廃水処理の3研究機関共同での実証評価体制

窒素処理概要

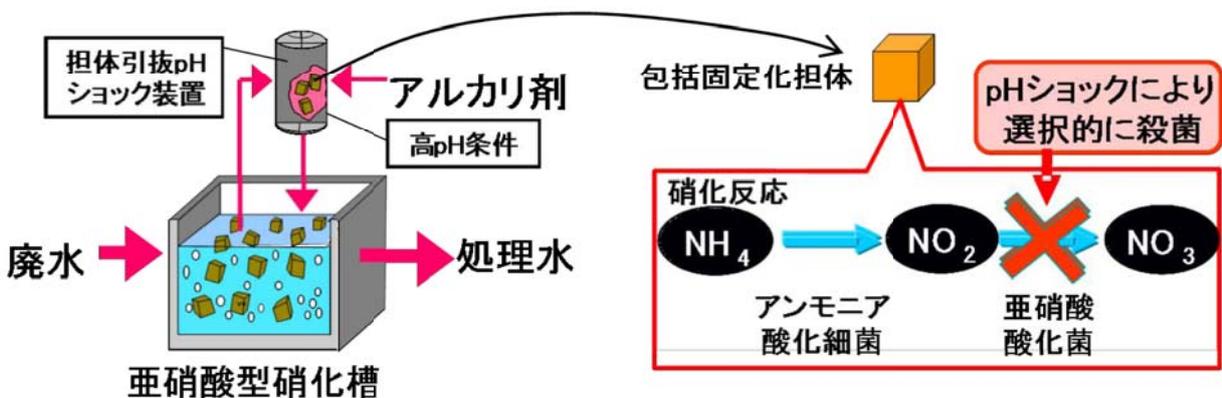


理論値

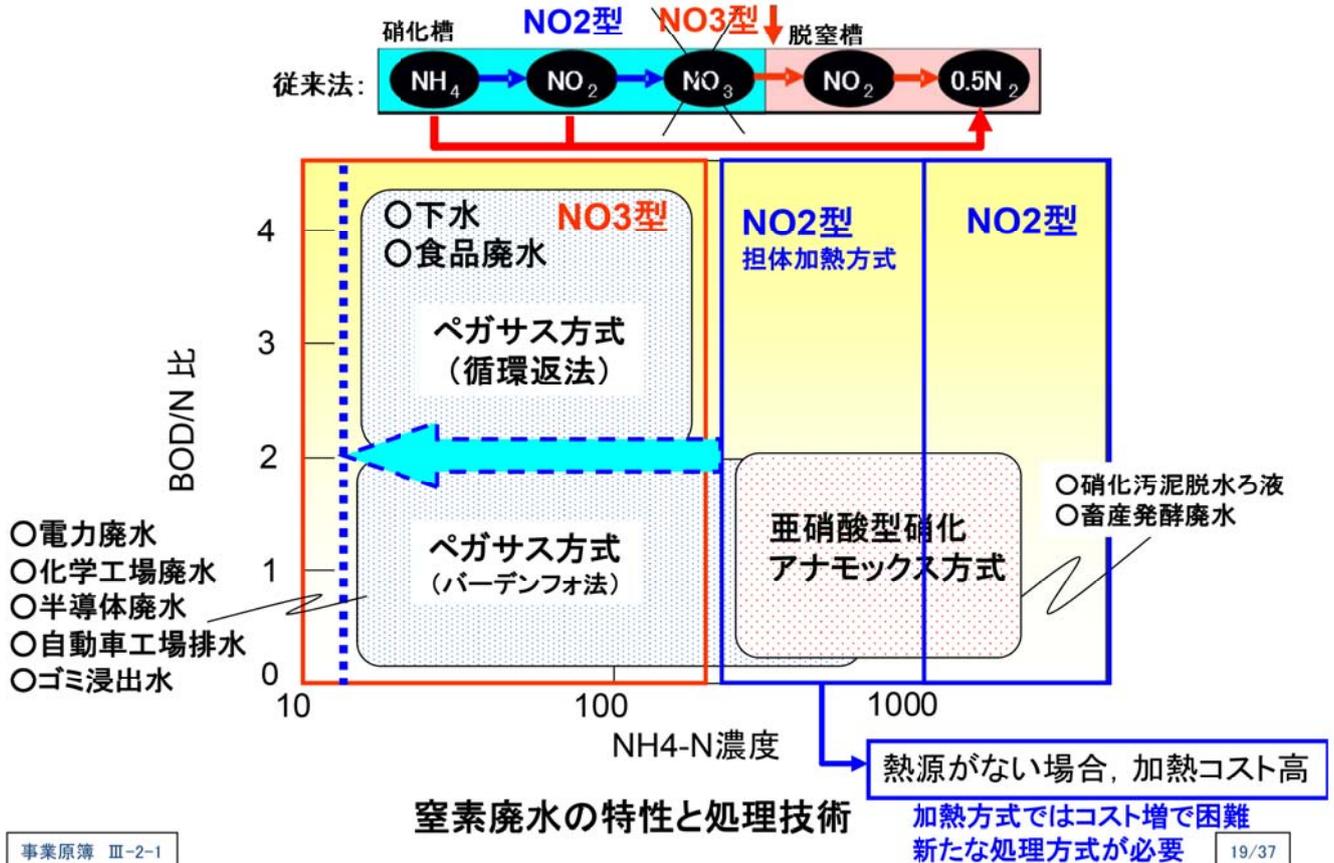
曝気量 : 55%削減
 メタノール : 86%削減
 汚泥発生 : 86%削減

pHショック法: アルカリ剤による有用微生物のスクリーニング技術

亜硝酸型硝化の原理 (弊社担当部分)



pHショック処理により特定菌だけを担体内に保持する方式で
 亜硝酸型硝化の安定処理を行う



窒素廃水の特性と処理技術

熱源がない場合, 加熱コスト高
加熱方式ではコスト増で困難
新たな処理方式が必要

19/37

1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

実廃水を対象とした亜硝酸型硝化の長期安定性評価
アルカリ剤の担体物性への長期影響評価

2) 一体処理試験による実証運転

アナモックス装置 (北大テーマ) と連結させ一体処理型廃水処理
後段への供給水となる亜硝酸型硝化処理水の窒素比率 (NH₄/NO₂) の安定性評価

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析

包括固定化担体中の微生物コミュニティ・メンバーの解析

4) 亜酸化窒素 (N₂O) 排出の解析

高濃度 NO₂ が蓄積する亜硝酸型硝化槽での温室効果ガス (N₂O) の調査解析

研究場所: 1), 2) 日立プラントテクノロジー / 3), 4) 中央大学

対象廃水：硝化汚泥脱水ろ液

Y市北部汚泥資源化センタ

大型冷蔵貯留タンク(12m³)

輸送(6t/月)

供試廃水

水道水

| 測定項目 | 平均濃度 (mg/L) |
|------------------------------|-------------|
| 懸濁物質(SS) | 48 |
| 生物学的酸素要求量(BOD) | 41 |
| 溶解性BOD | 28 |
| C-BOD | 33 |
| 化学的酸素要求量(COD _{Mn}) | 120 |
| 溶解性COD _{Mn} | 100 |
| ケルダール窒素(Kj-N) | 1,000 |
| アンモニア性窒素(NH ₄ -N) | 1,000 |
| 亜硝酸性窒素(NO ₂ -N) | 0 |
| 硝酸性窒素(NO ₃ -N) | 0 |
| 全りん(T-P) | 60 |
| リン酸態リン(PO ₄ -P) | 59 |



好気

検討結果

公開

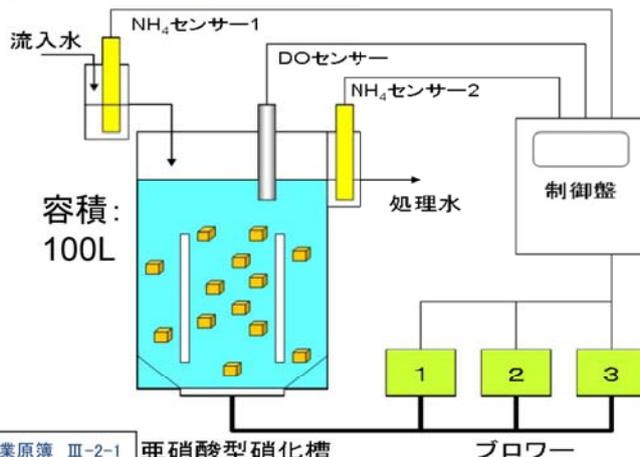
1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

実験条件

| 実験系 | NH ₄ -N濃度 (mg/L) | 硝化率制御 (57%) | 水温(°C) |
|--------|-----------------------------|-------------|--------|
| 原液処理系 | 1,000 | 有り | 30 |
| 希釈液処理系 | 200 | 無し | 20 |

(pH7.5制御)

実験装置

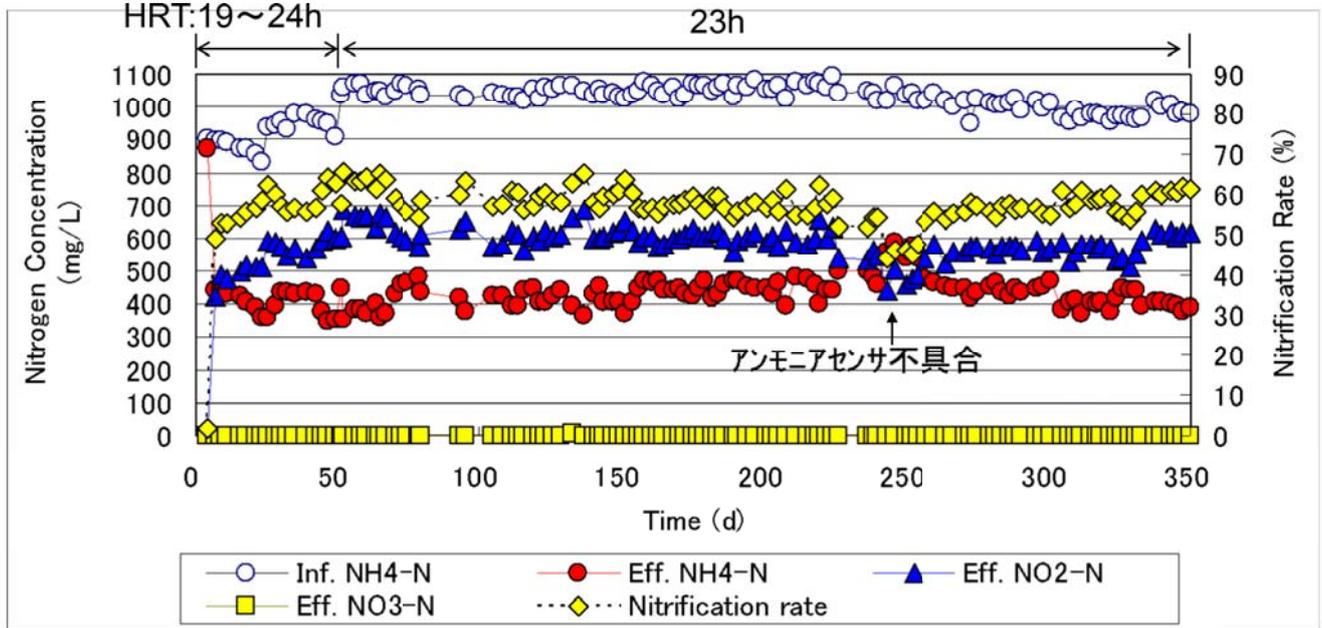


$$\text{硝化率} = \left(1 - \frac{\text{処理水NH}_4\text{-N}}{\text{流入水NH}_4\text{-N}} \right) \times 100$$

| 硝化率 | DO |
|-------------|----------|
| < 56 % | 4.0 mg/L |
| 56 % - 57 % | 2.0 mg/L |
| 57% < | 1.0 mg/L |

1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

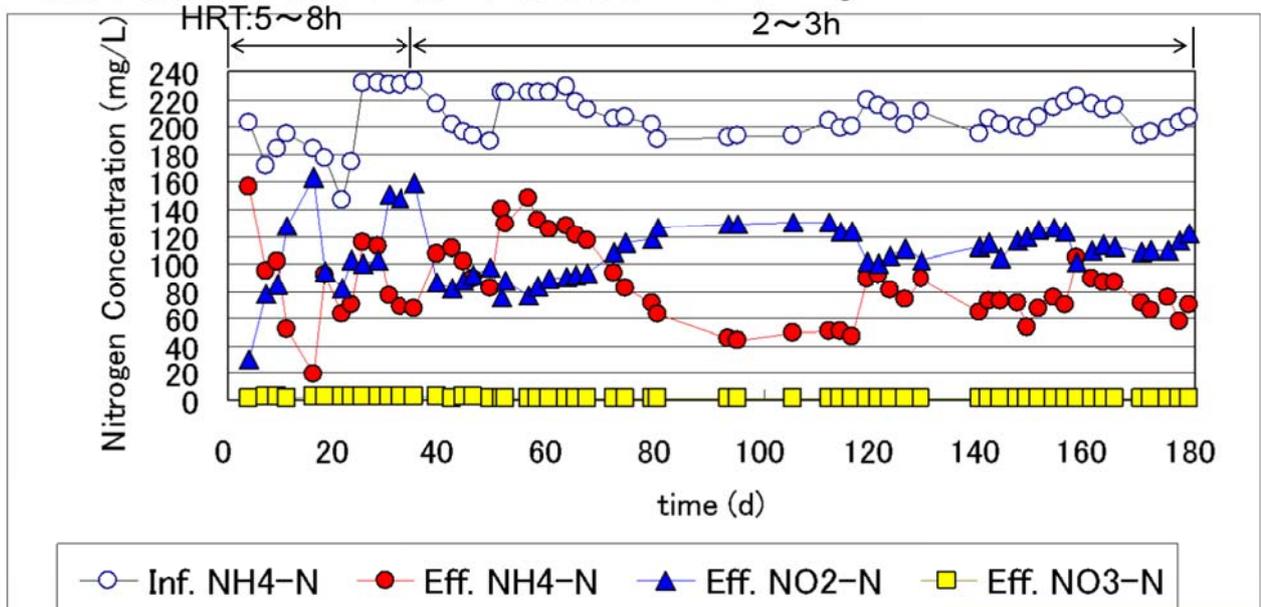
硝化率制御あり、水温30°C、pHショックなし



pHショック無しで、350日間安定した亜硝酸型硝化と硝化率を維持

1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

硝化率制御なし、水温20°C、pHショックなし DO >4mg/L



一般にNO3生成抑制には高い遊離NH3濃度が必要

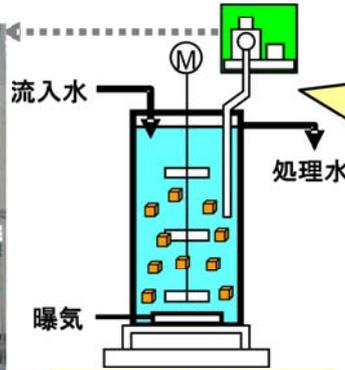
槽内遊離NH3-N 0.2~2mg/Lときわめて低い値

NO3生成抑制を維持

1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

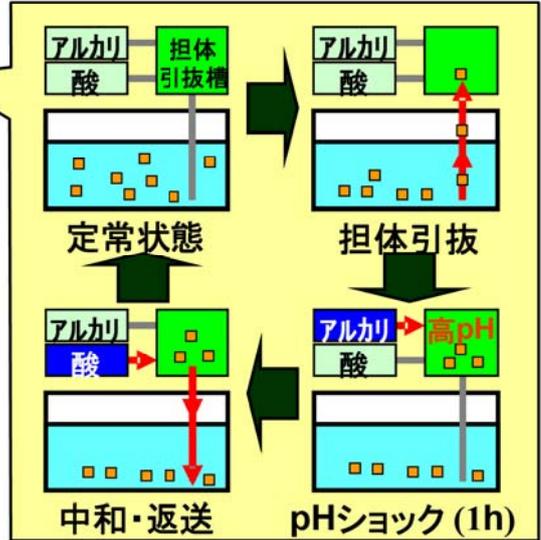
低濃度NH4廃水での評価

pHショック法(担体引抜き方式)による亜硝酸型硝化



担体引抜きpHショック処理装置 亜硝酸型硝化槽 [100 L]

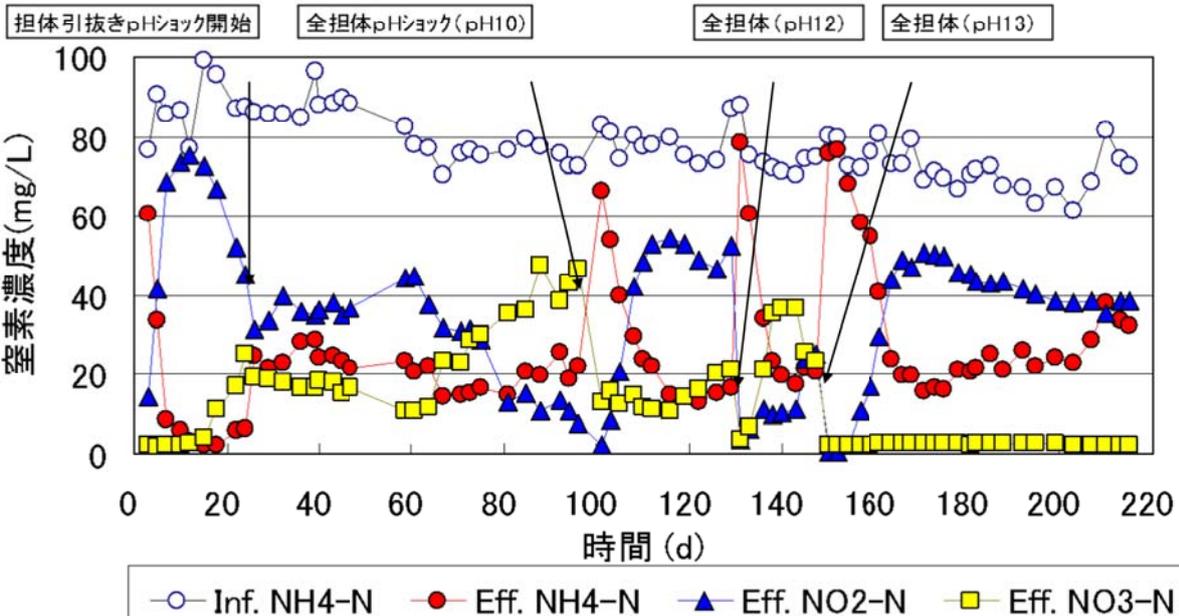
| 条件 | |
|---------|-------------|
| 担体引抜き量 | : 0.2L/回 |
| 担体引抜き回数 | : 1 回/日 |
| pH条件 | : pH 13、1時間 |



担体引抜きpHショック処理フロー

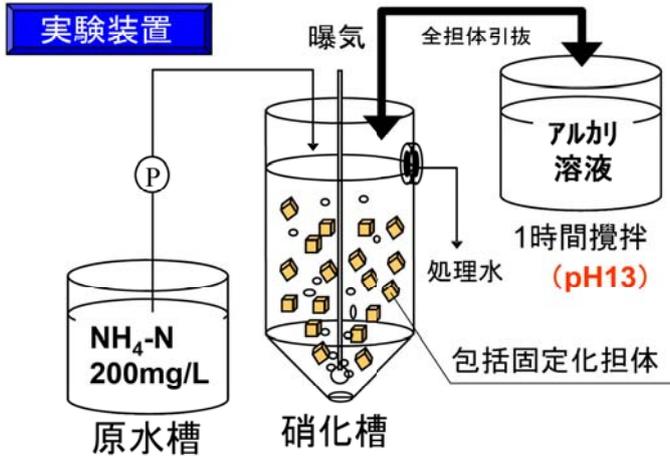
1) 亜硝酸型硝化反応の実証試験

硝化率制御なし、水温15-20°C、pHショックなし LDO >4mg/L



低濃度NH4廃水であっても、亜硝酸型硝化が可能であることを確認

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析



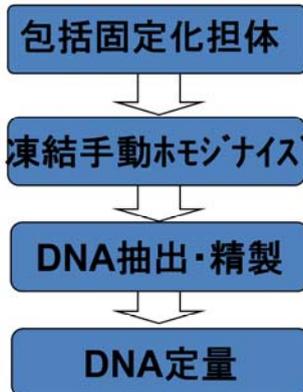
供試廃水

| 成分 | 濃度 (mg/L) |
|--|--------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 100~250 as N |
| NaHCO ₃ | 2.3 |
| Na ₂ HPO ₄ /12H ₂ O | 0.23 |
| NaCl | 0.10 |
| KCl | 0.048 |
| CaCl ₂ /2H ₂ O | 0.048 |
| MgSO ₄ /7H ₂ O | 0.17 |

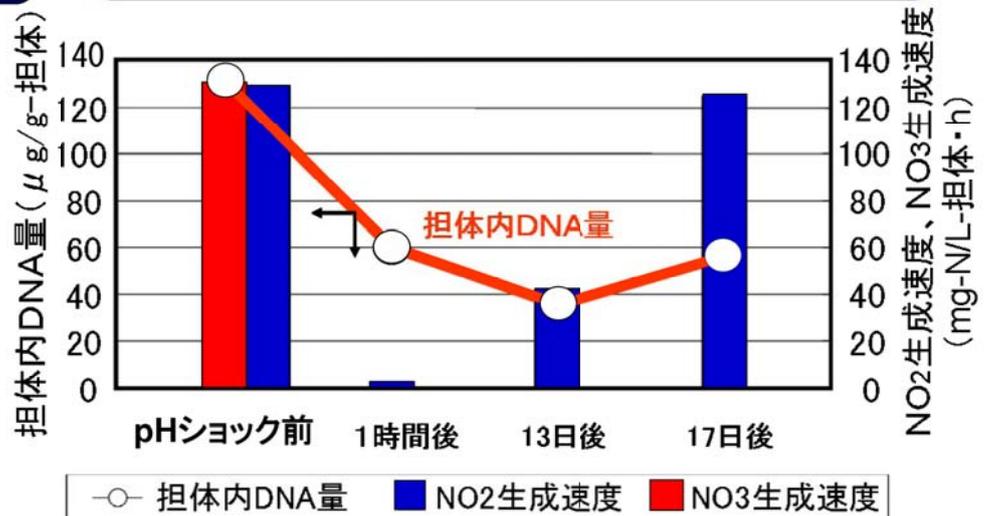
水温18°C, HRT 7.5 h, pH 8

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析

担体内DNA量の比較



合成排水処理の担体を対象とし、pHショック処理前後での担体内菌相解析を行った



担体内DNA量が半減してもpHショック前後でのNO₂生成速度は同等だった

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析

対象：
合成排水処理担体

DNAクローニング
<細菌16SrDNA>

包括固定化担体

凍結手動ホモジナイズ

DNA抽出・精製

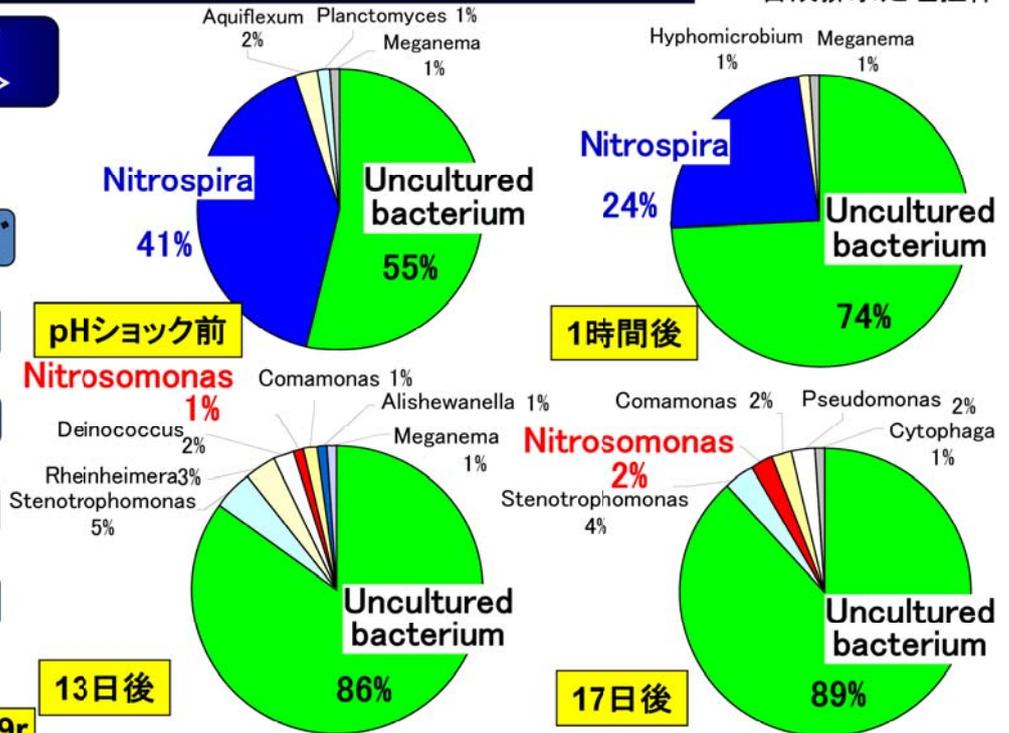
DNA定量

PCR

DNAクローニング

使用プライマー：

Bac8f & Univ529r



NOB (Nitrospira)が減少→亜硝酸生成が抑制

3) 亜硝酸型硝化を行う包括固定化担体菌相の解析

対象：
合成排水処理担体

CTOプライマーによって検出されたAOBクローン数

| 近縁種 | アニーリング温度 45°C | | アニーリング温度 55°C | |
|--|------------------|----|------------------|----|
| | 前 | 後 | 前 | 後 |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> strain ATCC 25978 | 90 | 94 | 88 | 96 |
| <i>Nitrosomonas oligotropha</i> | 2 | 0 | 2 | 0 |
| <i>Nitrosomonas</i> sp. Nm59 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| 合計解析クローン数 | 94 | 94 | 91 | 96 |

前：pHショック直前
後：pHショック後35日目

対象：合成排水処理担体

pHショックで残存する殆どのAOBは*Nitrosomonas europaea*近縁種であった

4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

硝化槽から漏出するガスをテドラーバッグに採取.



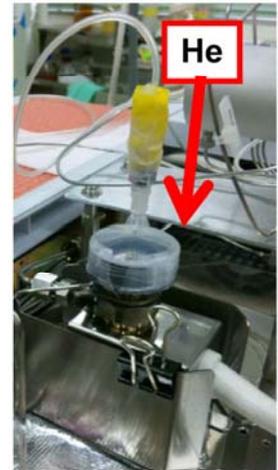
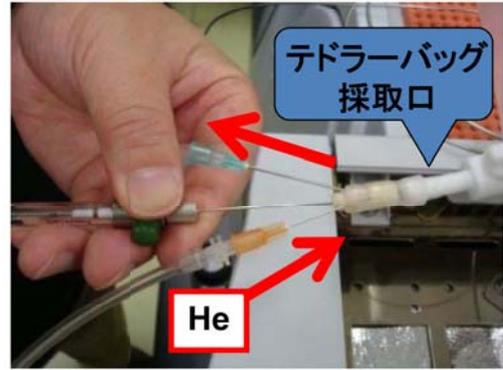
GC/四重極MS (GCMS-QP2010Plus, Shimadzu) を用いてN₂Oを測定.

大気の混入がないようにテドラーバッグ内のガスを50~100μL採取した.



N₂O/NH₄転換率:
除去されたNH₄-N量と発生したN₂O-N量から算出.

$$N_2O/NH_4 \text{ 転換率}(\%) = \frac{\text{(発生}N_2O\text{-N量)}}{\text{(流入}NH_4\text{-N量 - 残留}NH_4\text{-N量)}} \times 100$$

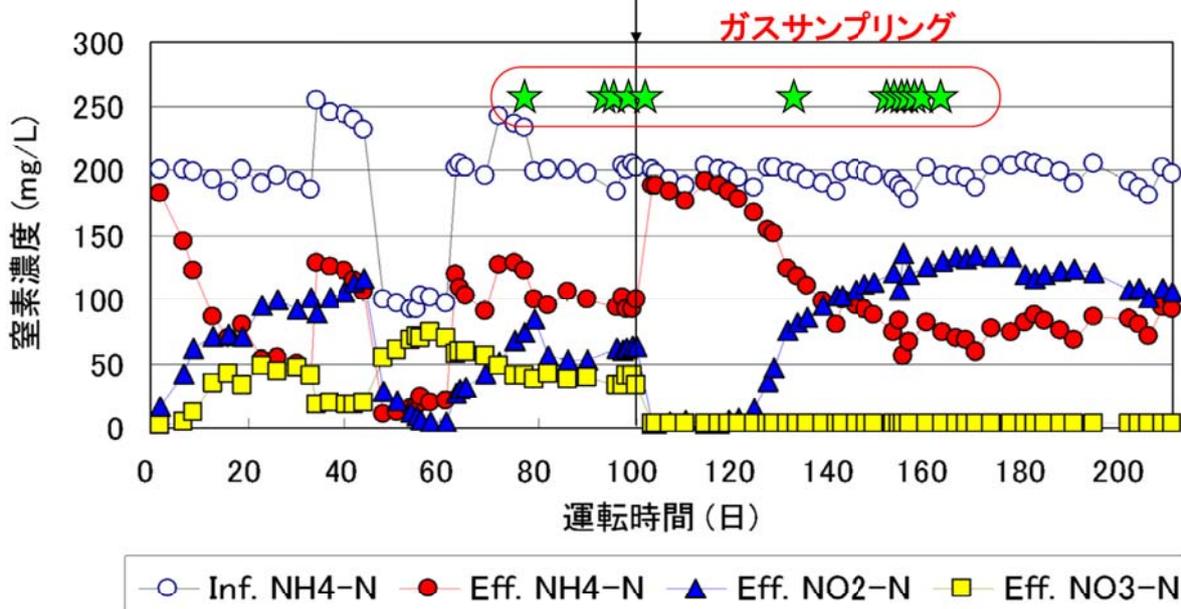


4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

対象: 合成排水処理担体

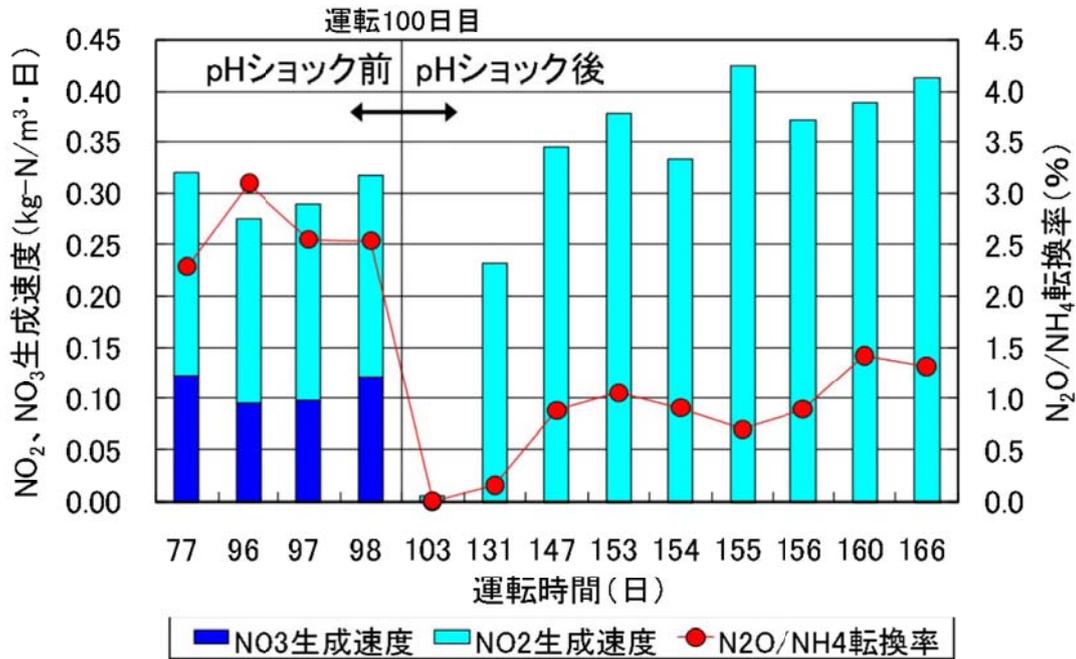
水温18°C, HRT 7.5 h, pH 8, DO6mg/L

pHショック処理 (pH13、1時間)



4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

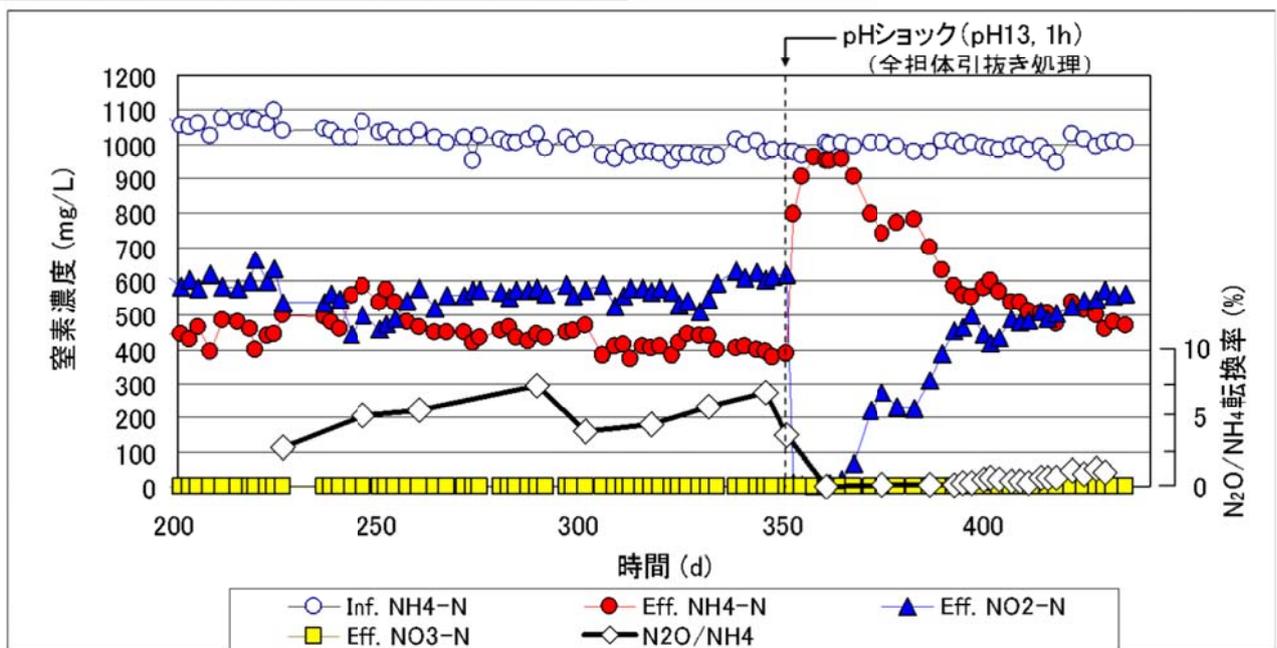
対象: 合成排水処理担体



pHショックによりN₂O/NH₄転換率が減少

4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

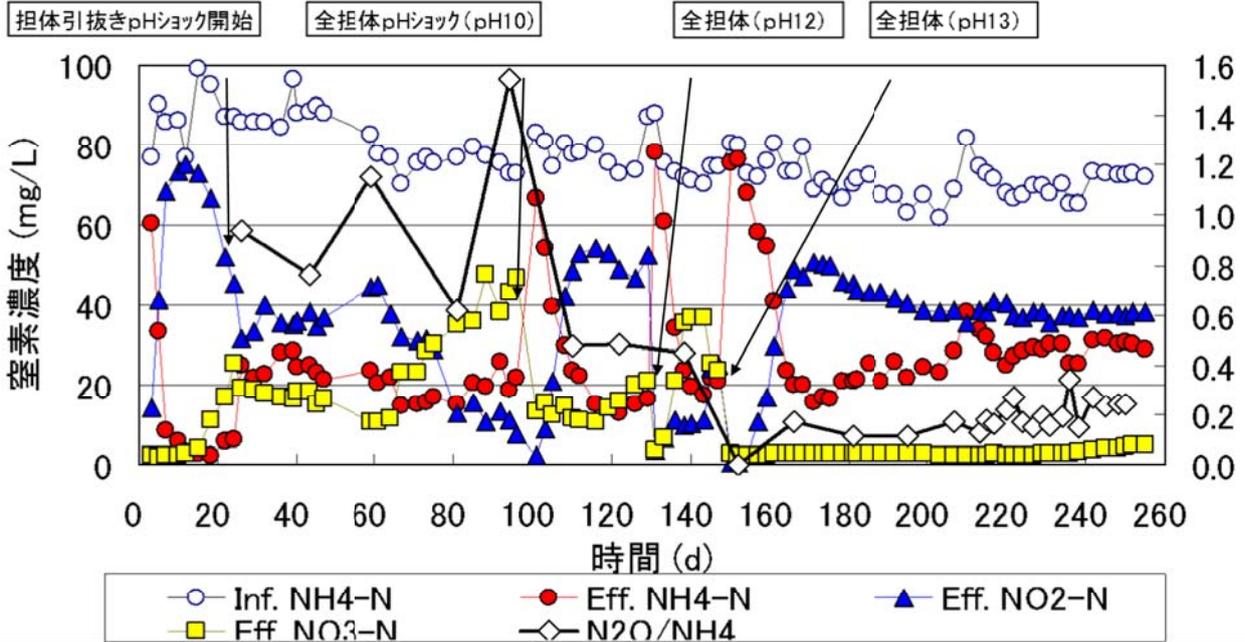
対象: 消化脱水ろ液 処理担体



実廃水処理においてもpHショックによりN₂O/NH₄転換率が減少

4) 亜酸化窒素(N₂O)排出の解析

対象: 消化脱水ろ液 処理担体

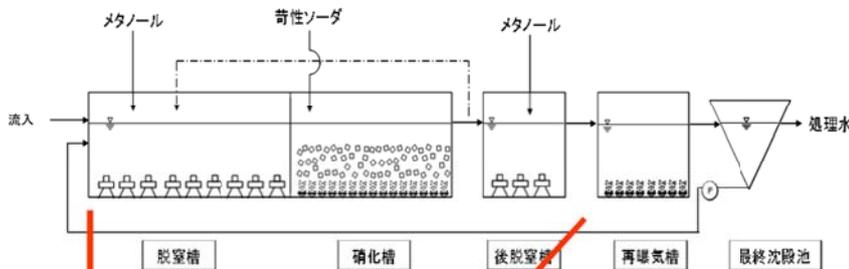


低濃度NH₄廃水処理においてもpHショックによりN₂O/NH₄転換率が減少

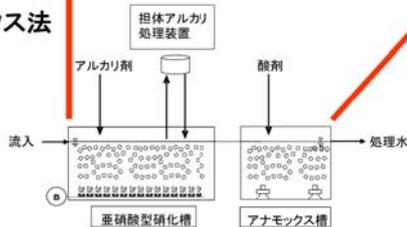
目標の達成度

| | |
|------|---|
| 流入水質 | NH ₄ -N約1,000mg/L BOD/N比=0.2 処理水量を100m ³ /日規模 |
| 処理水質 | T-N250 mg/L |

担体添加型バーデンフォ法



アナモックス法



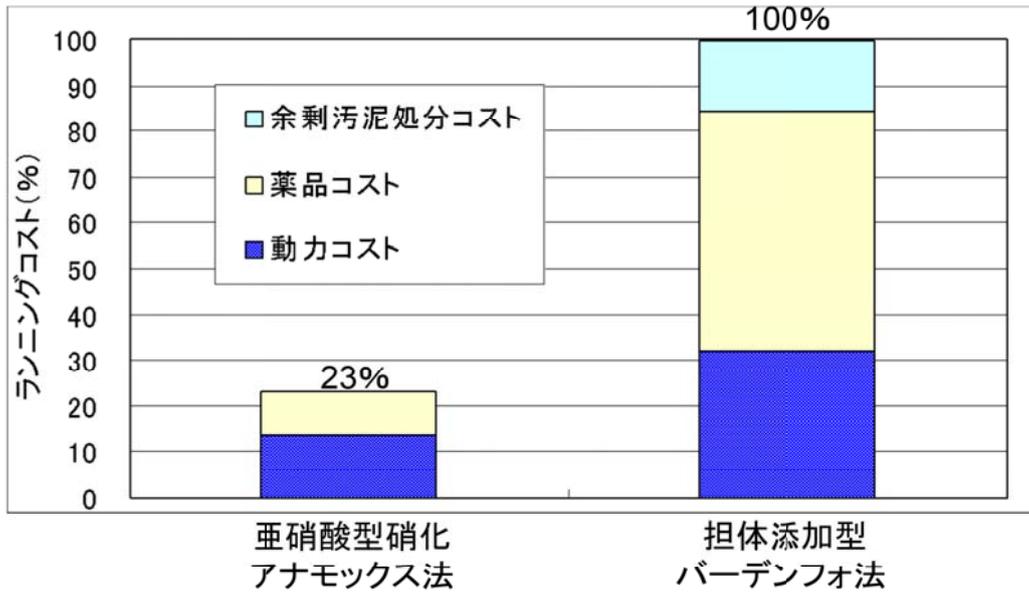
反応容積 約85%減

送風動力 50%
攪拌動力 90% } 削減

総動力エネルギー 約58%の削減効果

当社比: バーデンフォ法、アナモックス法

総ランニングコストの比較



当社比：バーデンフォ法、アナモックス法

微生物群のデザイン化による 高効率型環境バイオ処理技術開発

プロジェクトの詳細(公開)

NEDO バイオテクノロジー・医療技術部

委託先 広島大学

01/18

3. 研究開発成果について (1)(中間)目標の達成度

公開

密閉型DHSリアクターによる微生物叢のデザイン化

■ DHS(Downflow hanging sponge)リアクターの利点

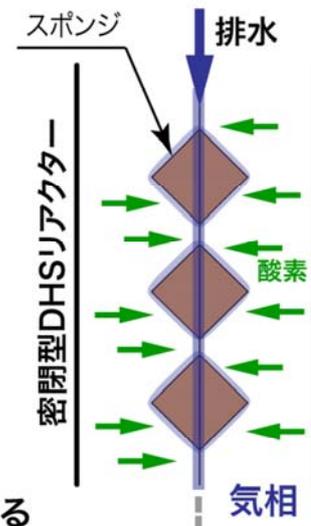
スポンジ担体を気相に吊るしているため

- ① 高濃度に微生物を保持できる
- ② エアレーション等の酸素供給が不要
(気相中から自然に供給)
- ③ 移流によりスポンジ内部にまで
基質・酸素が行き渡る
- ④ 保水性があるためHRTを自由に制御できる

■ 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

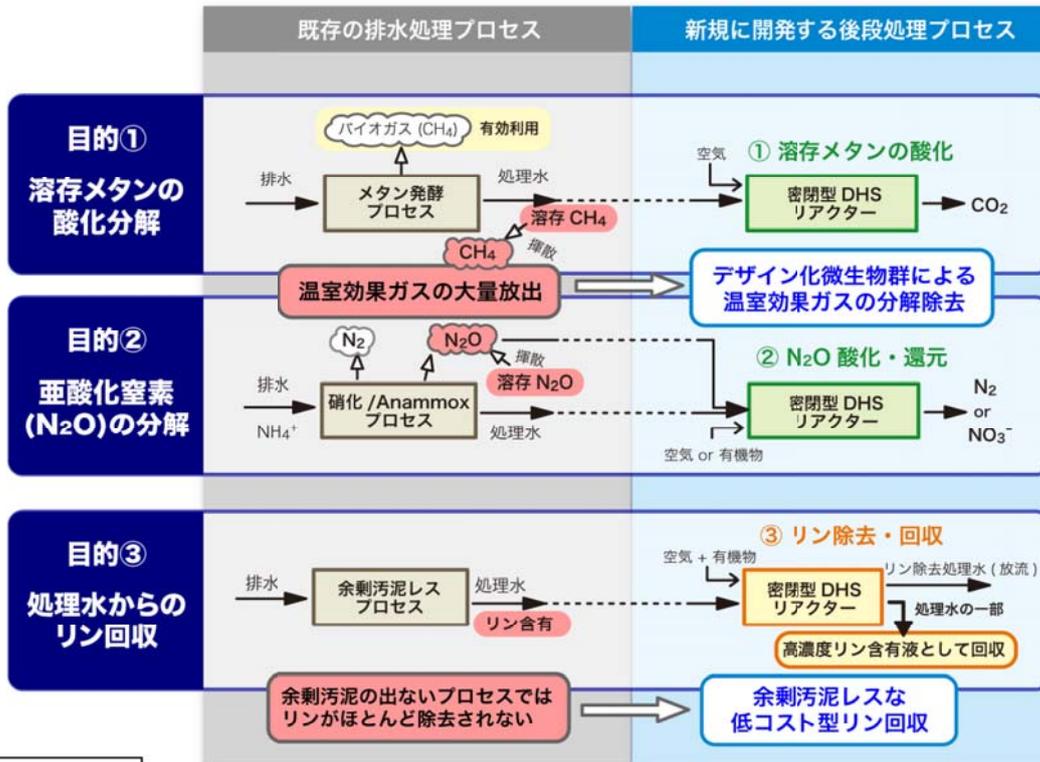
↓
処理対象にあわせた最適な微生物叢をデザイン化し、
既存排水処理を3倍効率化



事業原簿 Ⅲ-2-2

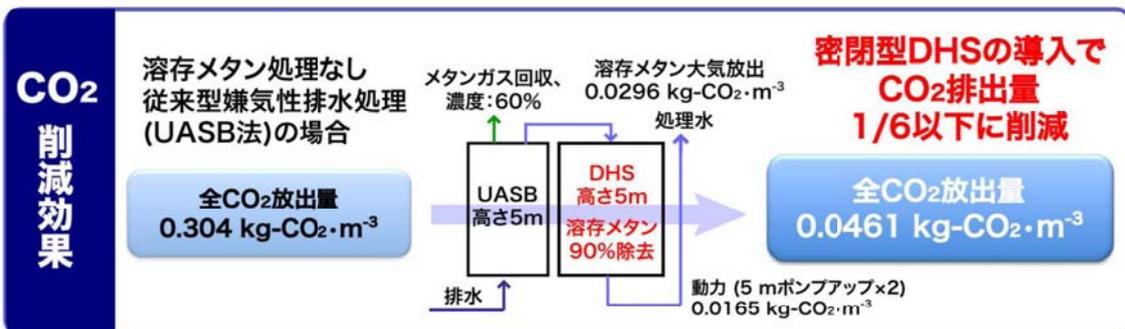
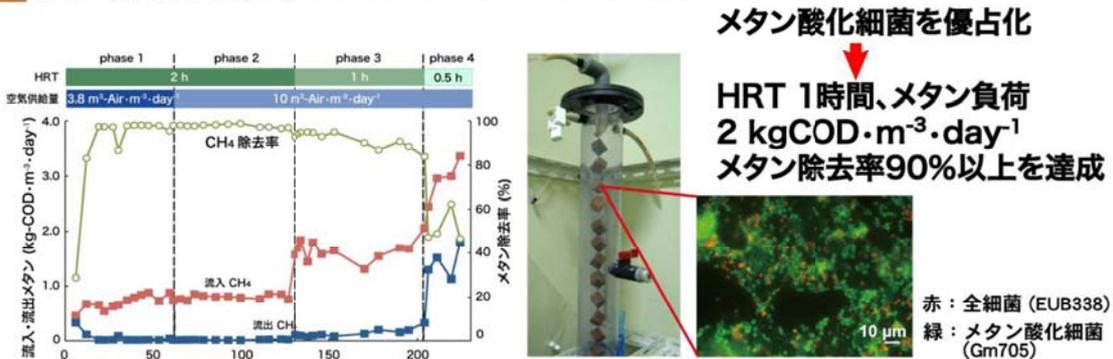
2/18

密閉型DHSリアクターを用いた排水処理の3つの高度化



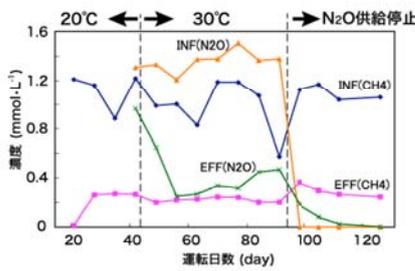
目的①: 溶存メタンの酸化分解による温室効果ガス排出削減

人工排水を用いた溶存メタン酸化分解実験

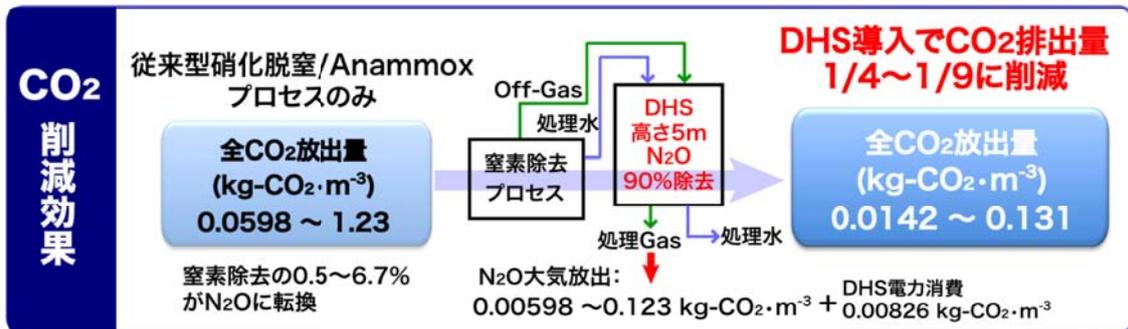


目的②: 亜酸化窒素の分解除去による温室効果ガス排出削減

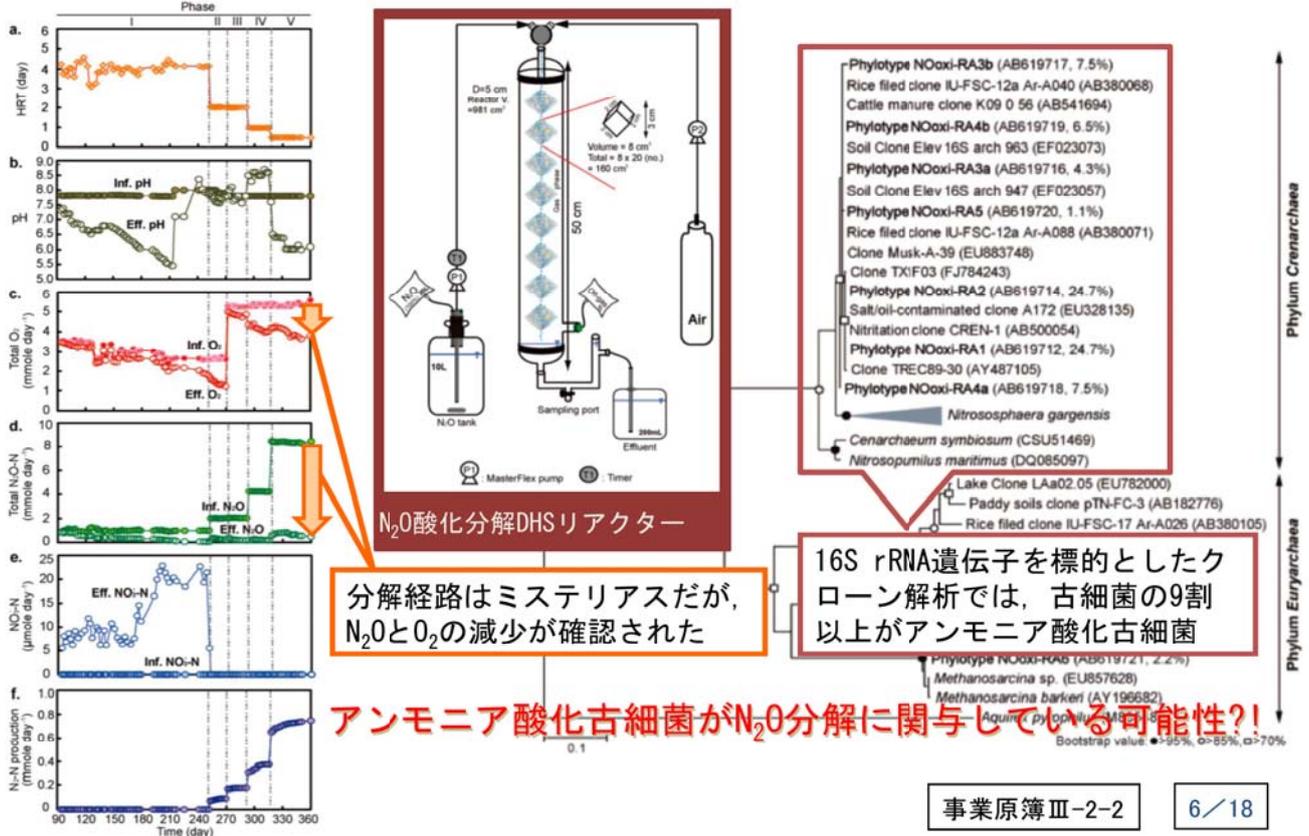
メタンを炭素源とした亜酸化窒素(N₂O)の分解(脱窒)



- 微生物の増殖と亜酸化窒素の減少を確認
N₂O除去速度0.14 kg-N·m⁻³·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

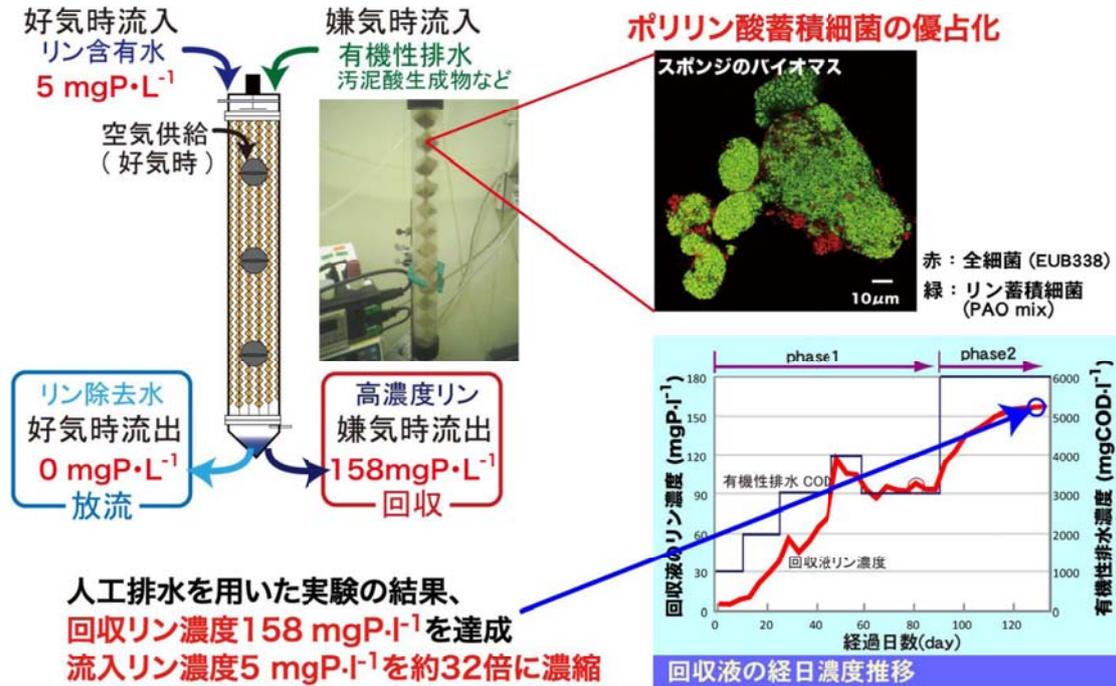


亜酸化窒素の酸化分解処理と微生物群集構造

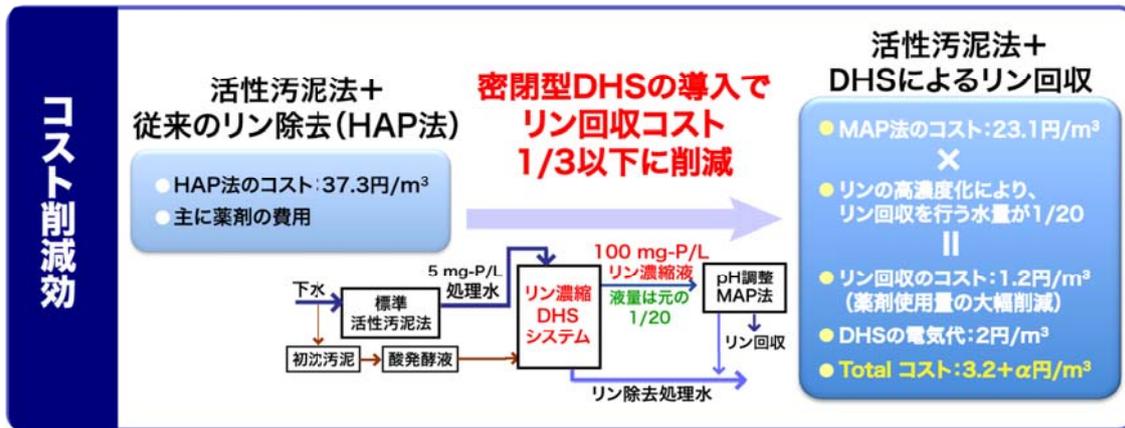


目的③: 余剰汚泥レス排水処理システムからのリン回収

■ 密閉型DHSによる新規なリン回収(特願2009-044797)



DHSを用いたリン回収のコスト削減効果

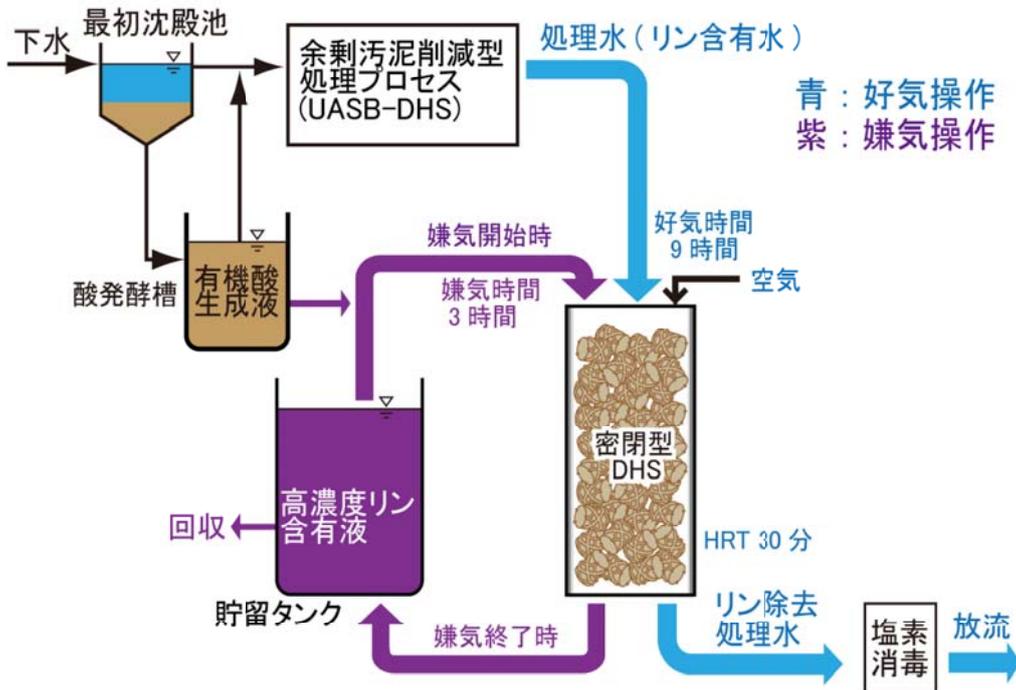


■ パイロット規模プラントによる実証試験へ

実下水(余剰汚泥レスプロセス処理水)からリン除去・回収できることを実証

目標: 濃縮液のリン濃度 $100 \text{ mg-P}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上

余剰汚泥削減型リン回収システムの概要



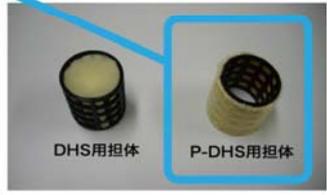
パイロット規模プラントによる実下水からのリン回収の実証

貯留槽容積：100L
 UASB高さ：1.5 m
 UASB容積：500 L
 (HRT 12時間)

DHS高さ：1.5 m
 DHS容積：524L
 DHS有効容積：250L
 (HRT 6時間)



PDHS高さ：2.2m
 PDHS容積：66L
 (HRT 1時間)
 PDHS有効容積：5L
 (HRT 7.2分)
 濃縮液槽：70L



下水処理 UASB-DHS システム リン除去回収 DHS システム

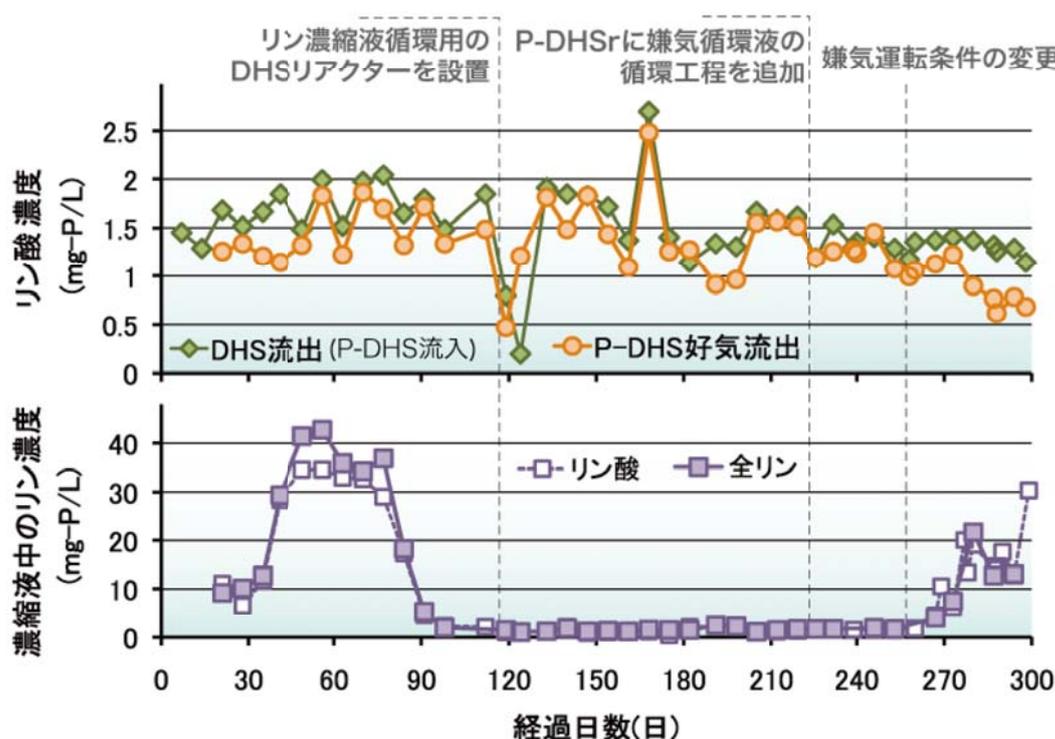
リン除去・回収性能を向上させるノウハウを蓄積し、運転・操作方法を確立

- ・リン濃縮液の好気処理の必要性 ← 循環 DHS リアクターを設置して対応
- ・嫌気運転開始時における、投入有機物の攪拌工程を追加
- ・嫌気運転時間を長く確保することで、リン除去・回収性能が向上

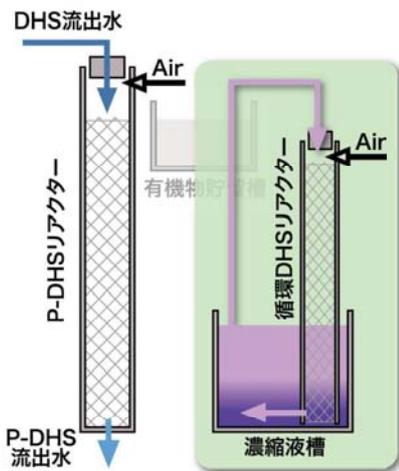
UASB-DHSシステムの処理性能

| Parameters | Unit | UASB inf. | UASB eff. | DHS eff. | 除去率 (%) |
|-------------------------------|--------|-----------|-----------|------------|---------|
| pH | - | 7.1 ± 0.2 | 7.2 ± 0.6 | 6.5 ± 0.6 | |
| DO | mg/L | 0.7 ± 0.3 | 0.7 ± 0.3 | 4.8 ± 1.6 | |
| T-CODcr | mg/L | 266 ± 58 | 196 ± 53 | 36 ± 13 | > 90% |
| BOD | mg/L | 171 ± 39 | 147 ± 34 | 14 ± 12 | > 92% |
| SS | mg/L | 67 ± 38 | 36 ± 32 | 3 ± 3 | |
| NH ₄ ⁺ | mg-N/L | 36 ± 1 | 35 ± 4 | 25 ± 6 | 30% |
| NO ₂ ⁻ | mg-N/L | 0 | 0.2 ± 0.1 | 1.8 ± 1.8 | |
| NO ₃ ⁻ | mg-N/L | 0.5 ± 0.1 | 0.6 ± 0.6 | 10.5 ± 8.5 | |
| SO ₄ ²⁻ | mg/L | 391 ± 95 | 275 ± 74 | 409 ± 84 | |

パイロット規模プラントによる実下水からのリン回収の実証



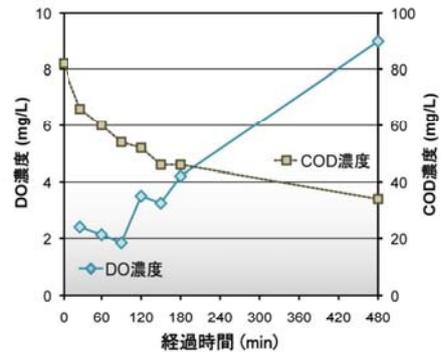
循環DHSリアクターによるリン濃縮液の好気処理



- 担体体積: 11.2 L (G3.2型スポンジ担体 400個充填)
- 流量: 60 L / 9 hrs
- HRT: 1.7 hrs



循環DHSリアクター設置状況



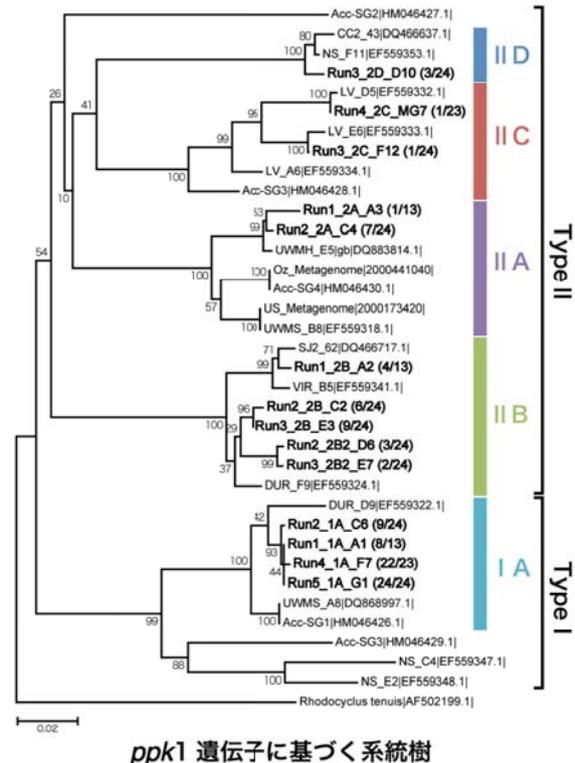
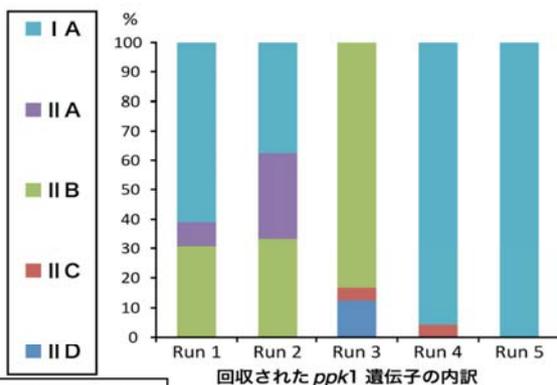
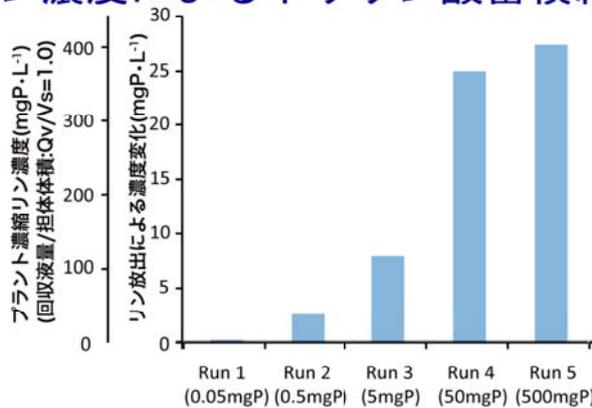
循環DHSリアクター稼働後の濃縮液槽のDO濃度およびCOD濃度プロフィール

P-DHSリアクター好気運転時にリン濃縮液を好気条件で循環させる

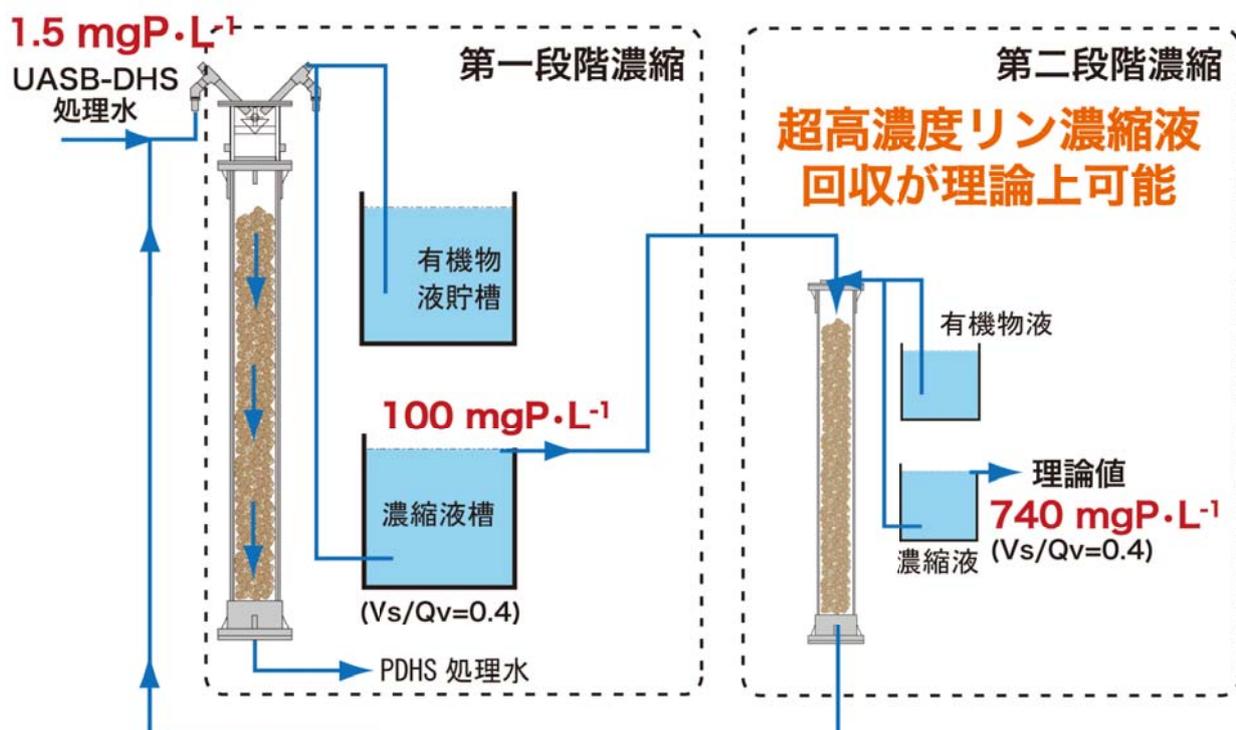
循環DHSリアクターの必要性

- ・ 残存有機物の除去, 濃縮液の好気化
- ・ 固形物のトラップ

リン濃度によるポリリン酸蓄積細菌の多様性



超高濃度リン濃縮化アイディア



事業原簿 Ⅲ-2-2

15/18

■ DHSリアクターによる溶存メタンの酸化分解

密閉型DHSリアクターを導入することで、CO₂排出量を1/6以下に削減可能

■ 亜酸化窒素ガス分解DHSリアクターの開発

DHSリアクターを導入することで、CO₂排出量を1/4~1/9に削減可能

■ リン除去・回収DHSリアクターの開発

密閉型DHSリアクターを導入することで、リン回収コストを1/3以下に削減可能

事業原簿 Ⅳ-2

16/18

■ 溶存メタンの酸化分解

溶存メタン・有機物・硫黄・アンモニアを含む模擬排水を用いた場合でも、密閉型DHSリアクターにより、90%以上の溶存メタン除去率をHRT 2時間で達成できることから、**実排水においても同程度の除去性能が期待でき、溶存メタン放散防止は直ちに実用化できる見通しである。**

■ 亜酸化窒素の分解

酸化分解やメタンを用いた還元ともに継続的に除去されることは確認できたが、除去率90%にはまだ至っていない。また、反応に関与する微生物群についても一部しか解明できていない。

実用化に向けては、亜酸化窒素分解微生物の至適環境条件の調査が必要である。

■ 排水処理水からのリン除去・回収

浄化センターに設置したパイロットプラントを用いて、実下水からのリン回収試験を行い、運転・操作方法を確立した。しかし、リン濃度を10倍以上に濃縮できることは実証できたが、実用化の目安となる $100 \text{ mg-P} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上のリン濃縮液の回収までには至っておらず、**実用化に向けてはパイロットプラントの運転を継続して、これを実証する必要がある。**

■ 実用化への見通し

- 模擬排水を用いた今までの検討で、DHSを用いたメタン酸化およびリン回収は当初想定した以上の良い結果を得ている。
- 本技術の基礎となっている好気性DHSリアクターの性能はインドや国内の下水処理場で既に実証されている。
- したがって本プロジェクトをこのまま推進し、実排水を用いてその性能を実証できれば、問題なく実用化される事が期待できる。



インドで稼働中のDHS実証プラント

■ 波及効果

従来 of 下水・排水処理技術に温室効果ガス処理・リン回収DHSリアクターを組み合わせる事で、21世紀型排水処理システムとして日本の技術を世界に向けて発信することができる。

微生物群のデザイン化による 高効率型環境バイオ処理技術開発

プロジェクトの詳細(公開)

NEDO バイオテクノロジー・医療技術部

委託先 北海道大学 地球環境科学研究所

01/19

3. 研究開発成果について (2)成果の意義

資料7-1-3

公開

「バイオフィルム工学による微生物(群)デザイン化」

北海道大学 地球環境科学研究所

事業目的

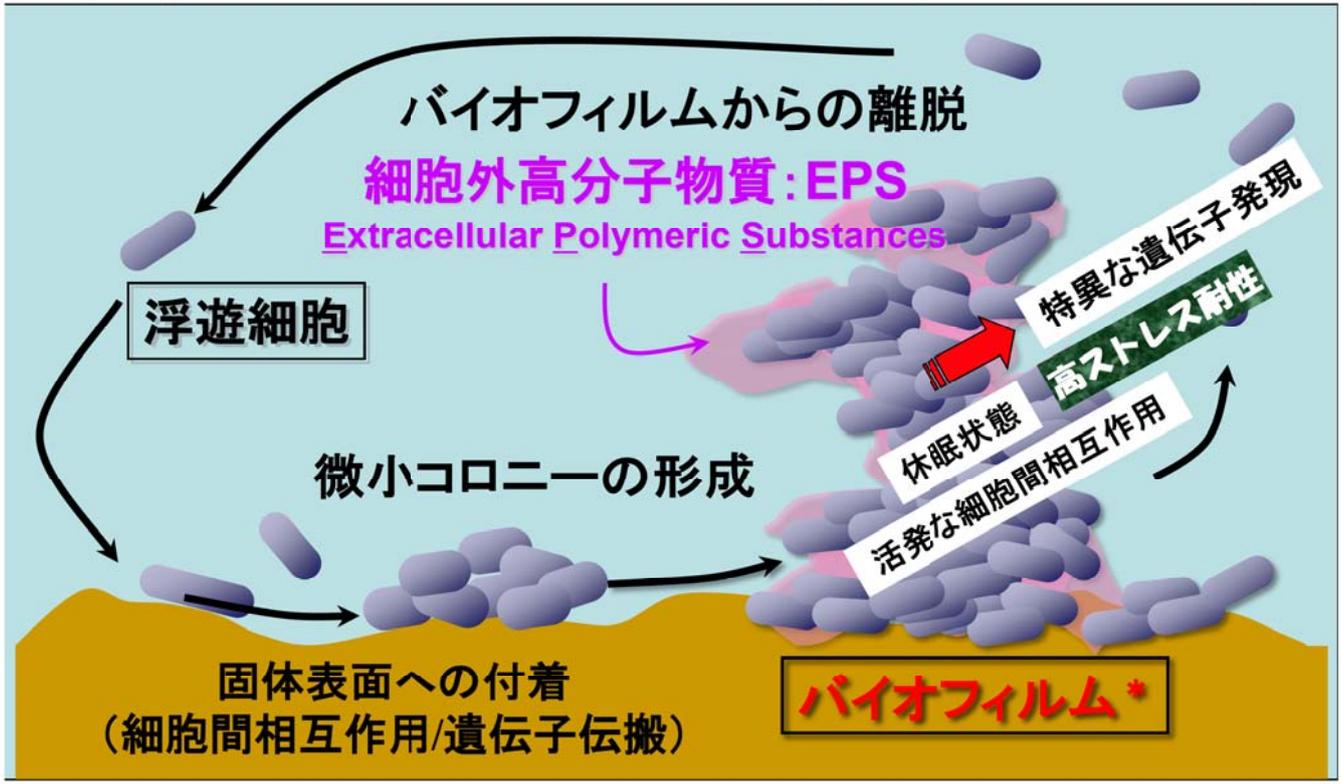
微生物の自然存在形態ともいえるバイオフィルムの形成という視点から複合微生物系における微生物間相互作用を理解し、さらにこれを制御すること(=バイオフィルム工学)によって廃棄物処理を効率化・安定化するための技術基盤(項目1から3)を開発する。

【項目1】バイオフィルム工学による活性汚泥法の効率化・安定化を目指す。具体的には硝化槽の性能の鍵となるアンモニア酸化細菌についてその特性をバイオフィルム形成の点から理解し、バイオフィルム形成による安定化を目指す(達成率100%)。また次世代の水処理システムとして期待される嫌氣的アンモニア酸化法において中心的な役割を果たす Anammox菌についてもバイオフィルム工学的手法を適用し、その特性の理解と安定化を目指す(達成率80%)。

【項目2】遍在する環境汚染物質として炭化水素類を取り上げ、その分解細菌群の汚染現場への安定的な導入法の技術基盤をバイオフィルム工学の視点から開発する(達成率100%)。

【項目3】植物との共生関係を利用した炭化水素類分解細菌のデザイン化および汚染現場への安定的な導入法を開発する(達成率200%)。

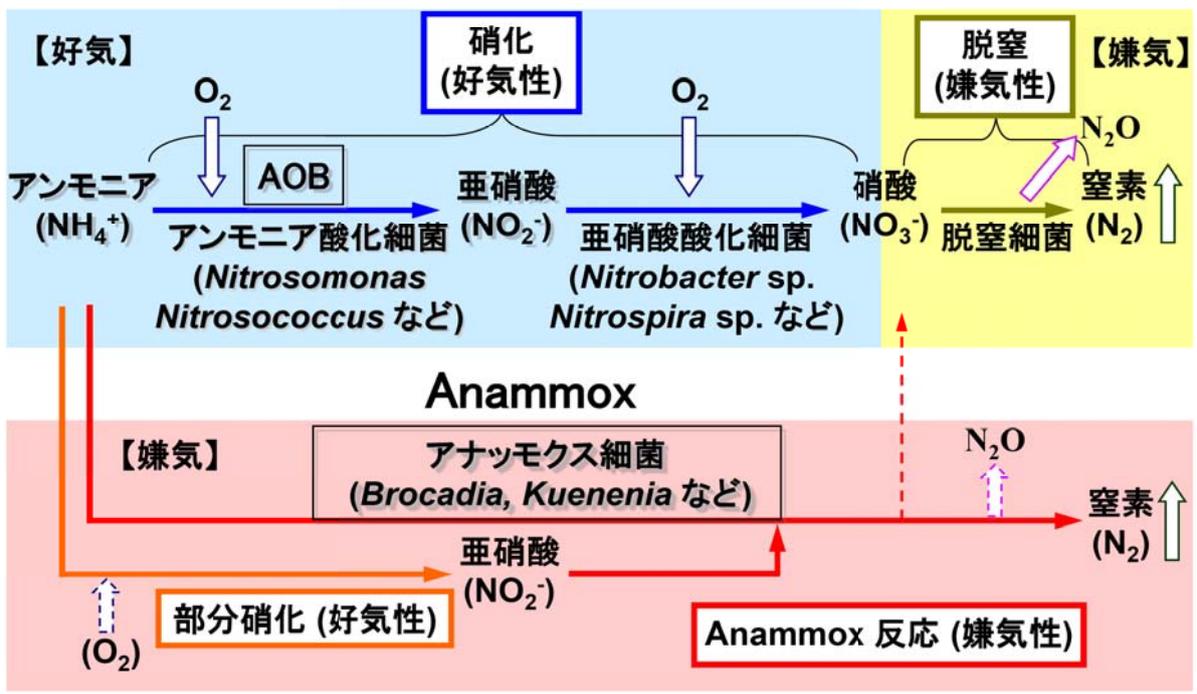
【背景: バイオフィルムの形成過程～微生物の自然な生態】



* バイオフィルムと活性汚泥(フロック)は似た環境と予想される

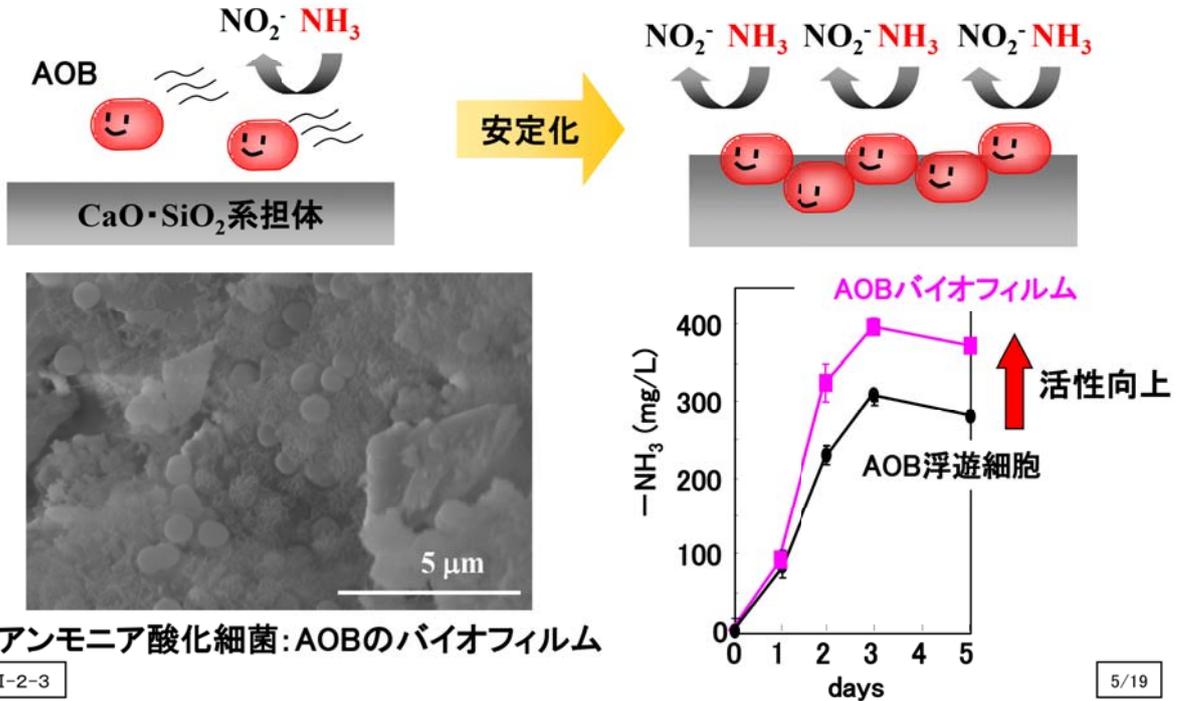
【背景: 細菌群による窒素処理～活性汚泥法と Anammox】

活性汚泥法(二槽式)



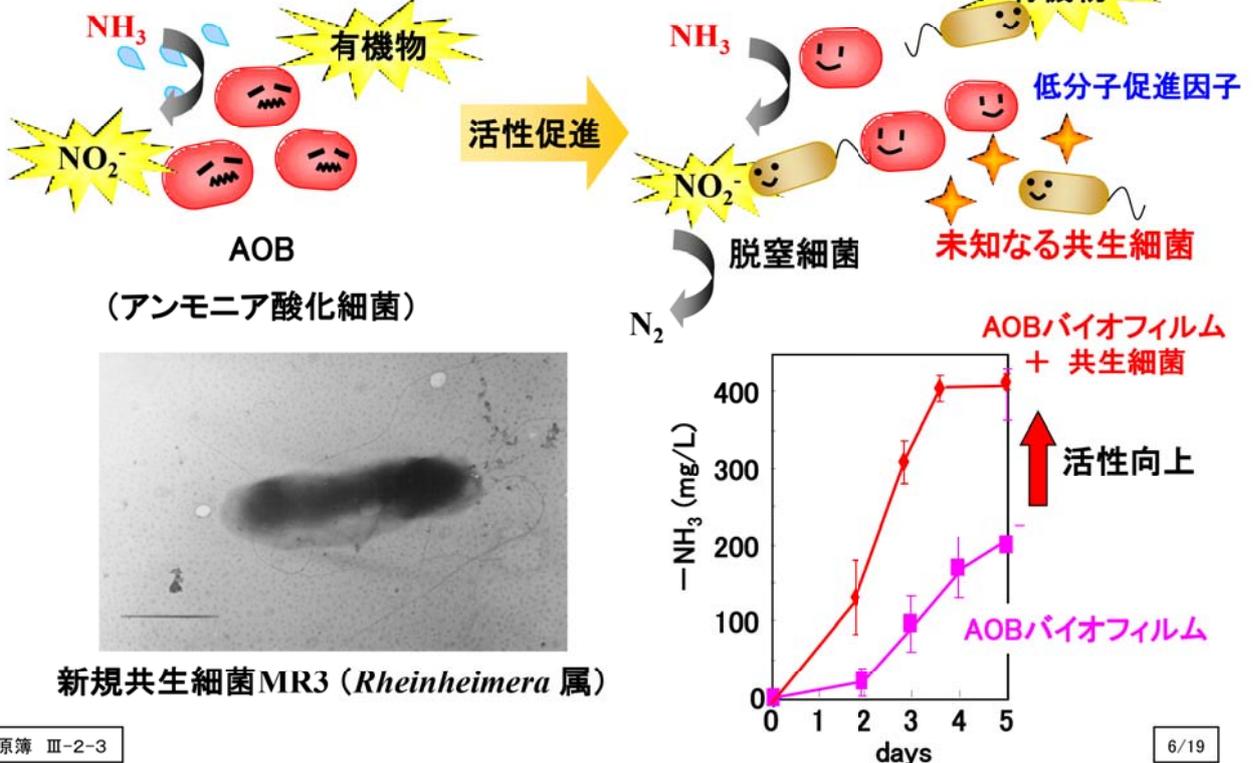
【項目1:アンモニア酸化細菌群のデザイン化 1】

AOB の純粋バイオフィルム化に成功し、
アンモニア酸化活性が 30%程度向上することを確認した

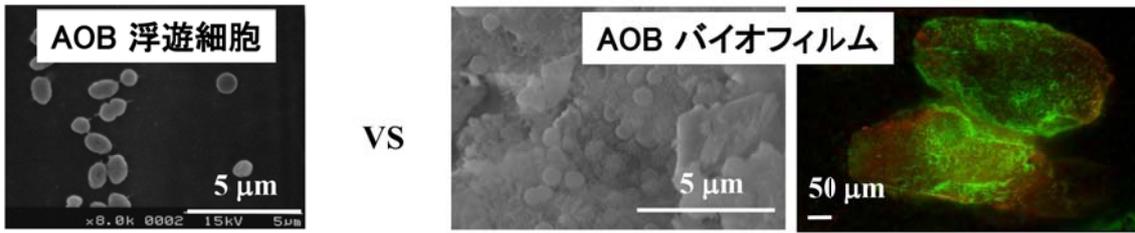


【項目1:アンモニア酸化細菌のデザイン化 2】

活性汚泥から新規共生細菌を発見し、さらにアンモニア酸化
活性の向上に成功した

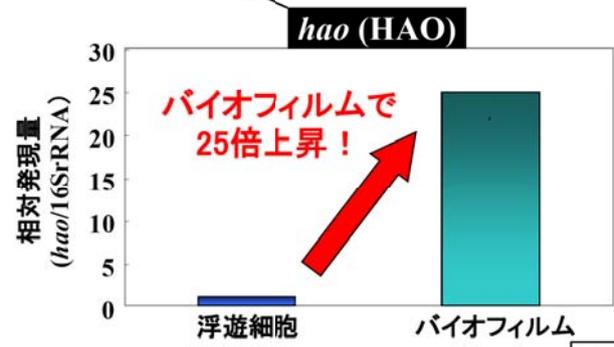
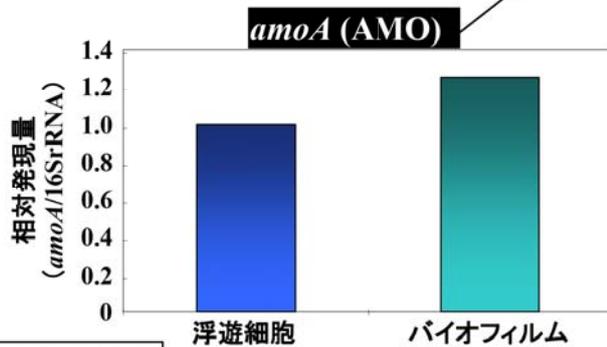


バイオフィルム化によるアンモニア酸化活性向上の原因遺伝子の特定

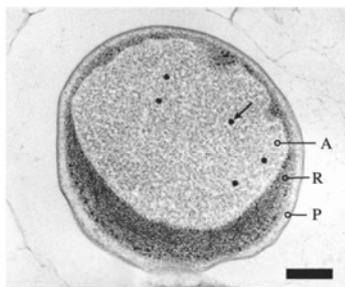


| | タンパク量 (mg/ L) | アンモニア酸化速度 (mg/ L/ 2-days) | アンモニア酸化比活性(mg-NH ₃ /mg-protein/ L/ 2-days) |
|-------------|---------------|---------------------------|---|
| AOB バイオフィルム | 72.5±36.7 | 438.3±32.2 | 6.05 |
| AOB 浮遊細胞 | 120.2±53.9 | 284.8±13.1 | 2.37 |

2.5倍高い！

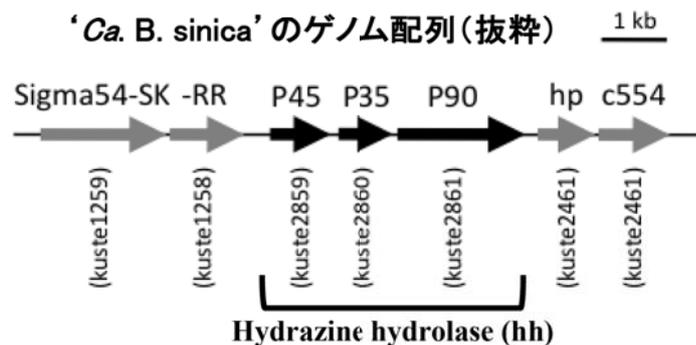


【Anammox細菌 *Ca. Brocadia sinica* 膜タンパク質解析】



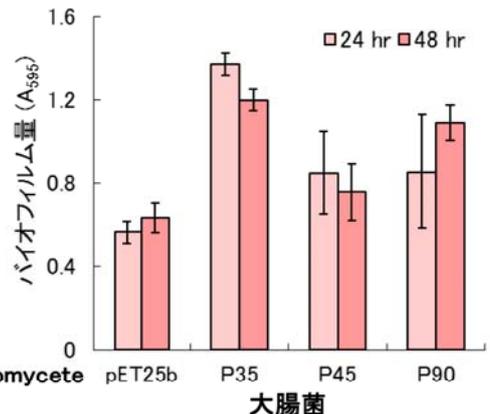
'*Ca. Brocadia sinica*'

'*Ca. B. sinica*' が Anammox 反応に重要な酵素 (hydrazine hydrolase) が膜画分に著量生産されていること、およびその遺伝子発現制御因子 (Sigma54-SK/RR) が '*Ca. K. stuttgartiensis*' とは異なることを見出した。また、hydrazine hydrolaseを大腸菌細胞膜に発現させ、バイオフィルム形成活性が昂進することを示した。Anammox細菌のグラニュール形成に関与？



Tojo F, Itoh Y, Okabe S, Morikawa M. (2011) Analyses of three dominant membrane proteins from anammox planctomycete '*Candidatus Brocadia sinica*' *J. Environ. Biotechnol.* 11, 77-81

組換え大腸菌のバイオフィルム形成



AOB をバイオフィルム化し、活性汚泥細菌 (*Rheinheimera* 属) を共存させること (微生物群デザイン化) によって、アンモニア処理活性を 2~3 倍程度上昇させることに成功した。

AOB のアンモニア酸化活性を促進する新規共生細菌 *Rheinheimera* 属 MR3 を発見し、その作用分子機構の一部を明らかにした。

▶ 活性汚泥内の複合微生物相互作用の理解が進んだ。

AOB を $\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ 系担体にバイオフィルム化させ、そのアンモニア代謝活性促進機構を遺伝子レベルで明らかにした (*hao* 高発現を世界で初めて示した)。

▶ 擬似的な活性汚泥環境における AOB アンモニア代謝活性促進機構の理解に貢献した。

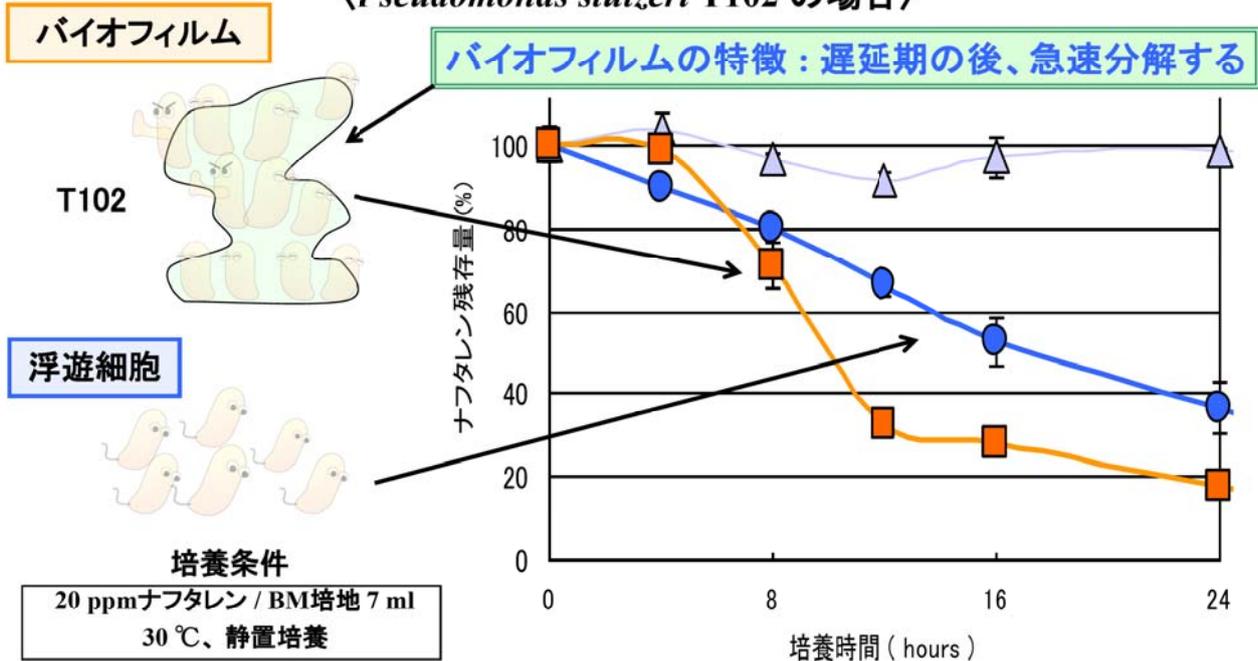
膜タンパク質解析によって、*Ca. Brocadia sinica* の Anammox 反応の特徴の一部を明らかにした。グラニュール形成への関与を間接的に示唆した。

▶ 生理学的特性で不明な点が多い Anammox の理解が進んだ。

【項目2: 原油汚染土壌浄化細菌 T102 のデザイン化】

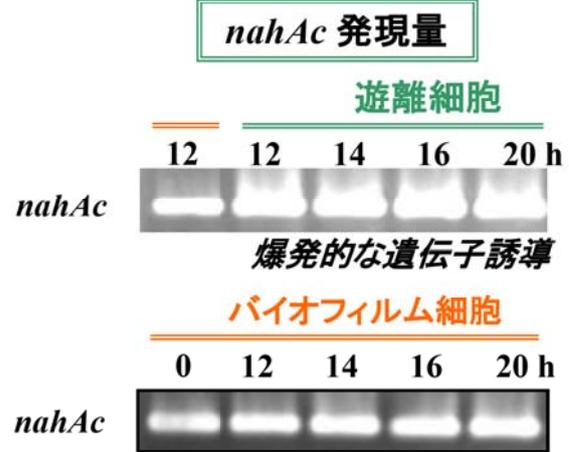
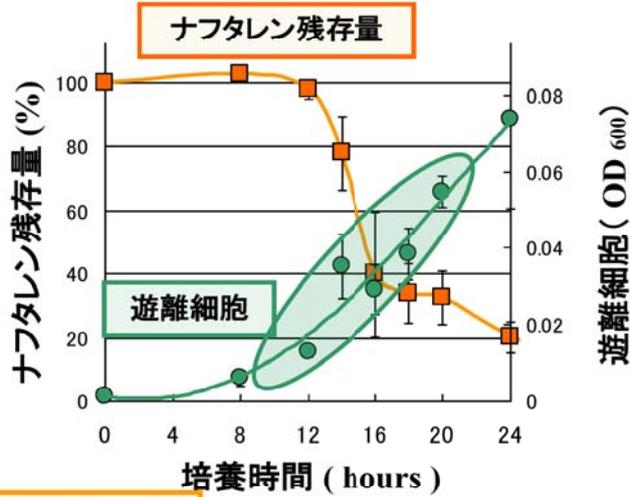
〈バイオフィルムと浮遊細胞のナフタレン分解活性比較〉

〈*Pseudomonas stutzeri* T102 の場合〉

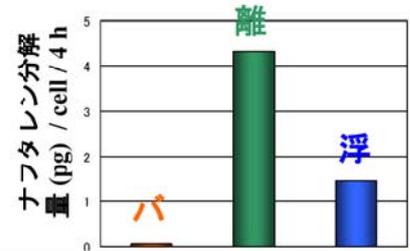
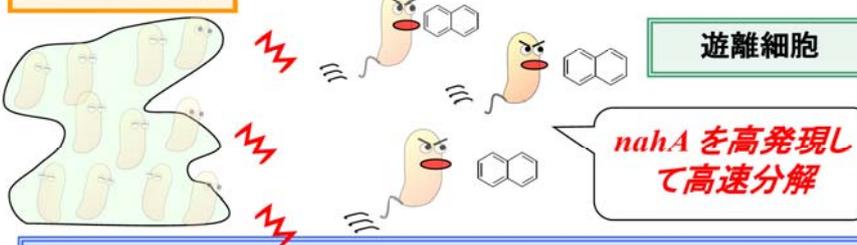


バイオフィルムと浮遊細胞では T102 のナフタレン分解特性が異なる

〈バイオフィルムと遊離細胞のナフタレン分解遺伝子比較〉



バイオフィルム



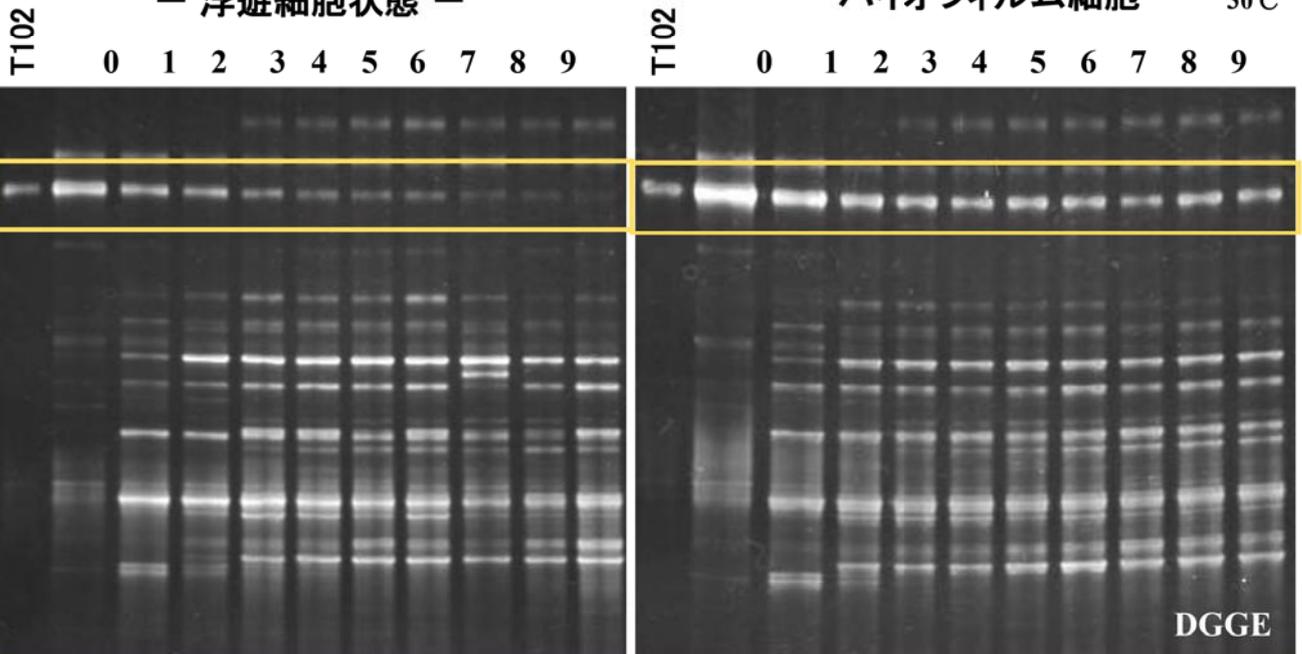
ナフタレン急速分解は、バイオフィルムから遊離した高活性細胞に由来する

〈T102 導入実汚染土壌の菌叢解析 16SrRNA-rtPCR-DGGE〉

Pseudomonas stutzeri T102 (□) vs 汚染土壌細菌群

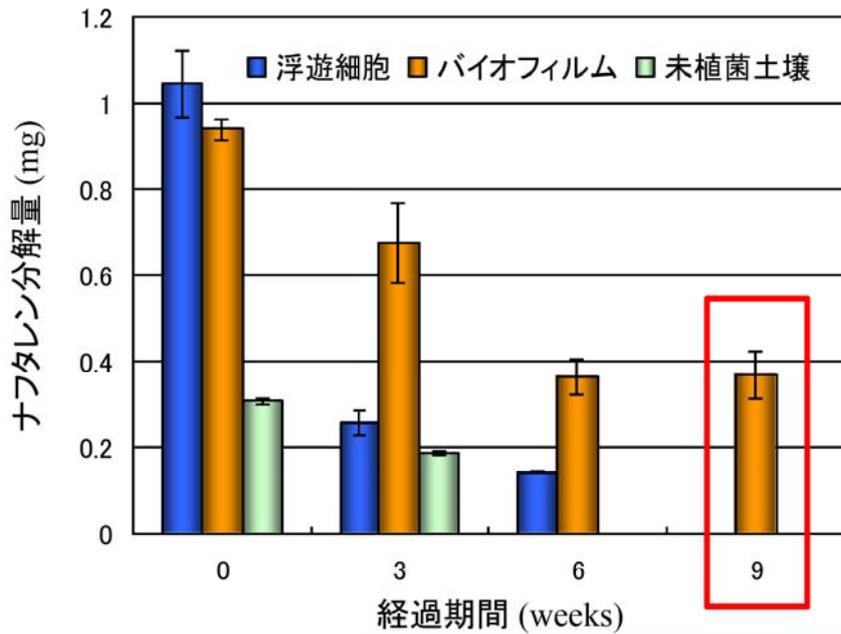
— 浮遊細胞状態 —

— バイオフィルム細胞 — 30℃



浮遊細胞よりもバイオフィルム細胞の方が実汚染土壌に長期間定着できる

〈T102を導入した実汚染土壤のナフタレン分解活性比較〉



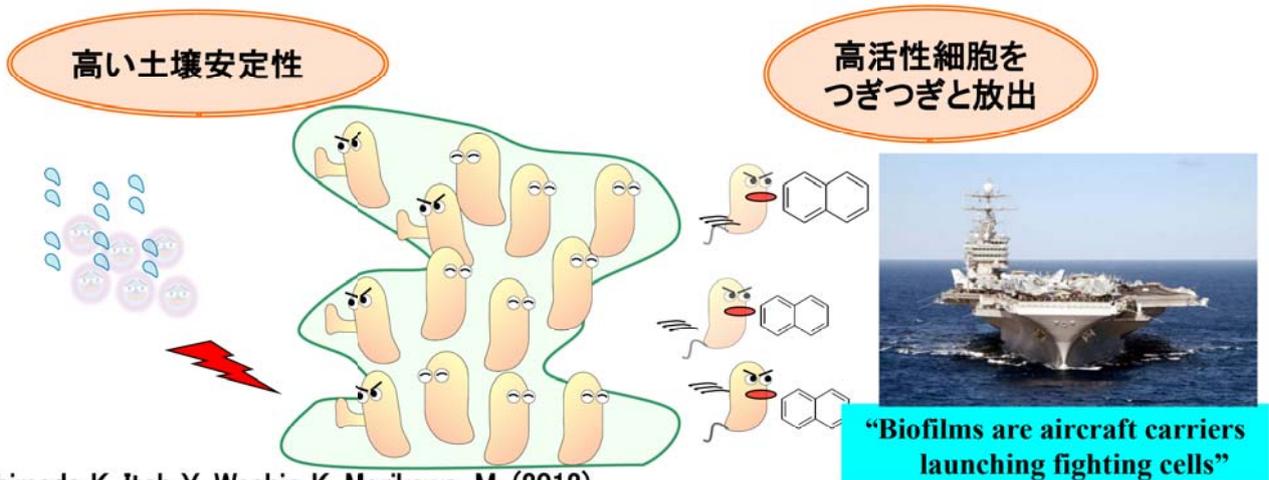
＜培養条件＞
 2 mg ナフタレン / BM培地 20 ml
 土壤 0.5 g 植菌後
 30 °C、36 時間 静置培養

T102 バイオフィーム保有土壤はナフタレン分解活性を長期間維持する

【項目2】 【まとめ】 原油汚染土壤浄化細菌のデザイン化

ナフタレン分解細菌をバイオフィーム化することで分解持続性を大幅に拡大(効率化)することに成功した。

バイオフィームの高分解活性持続性の要因は「高い環境耐性」と「高活性細胞の放出」であることを初めて発見した



Shimada K, Itoh Y, Washio K, Morikawa, M. (2012) Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms. *Chemosphere* 87, 226-233

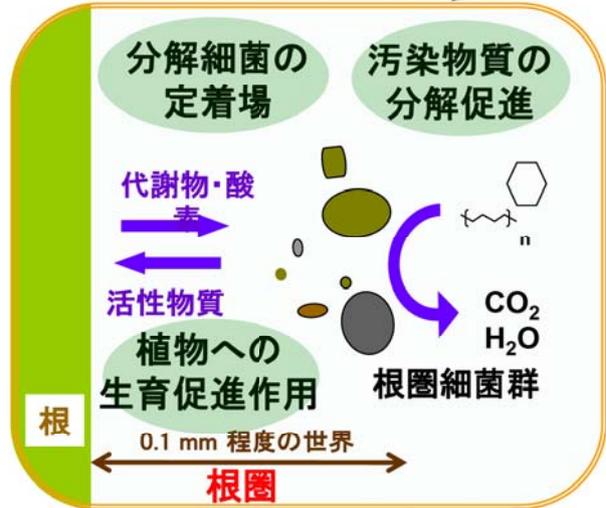
【植物—根圏細菌群のデザイン化コンセプト】



根圏バイオフィルム工学：
植物と根圏細菌の共生作用を高度利用する環境浄化法

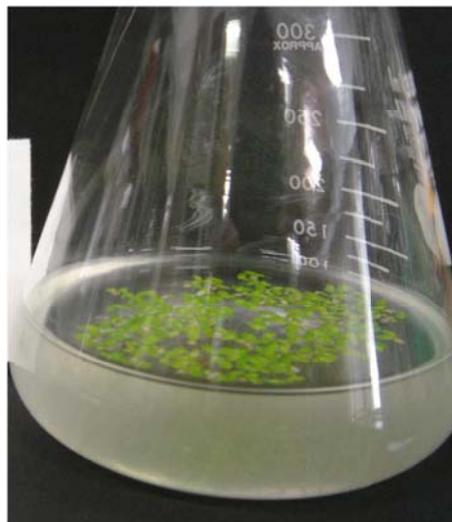
＜根圏バイオフィルム工学の利点＞

- 植物根から代謝物や酸素が供給
⇒ 分解細菌の生育促進、
代謝活性化
- 分解細菌に定着の場を提供
⇒ 付着することで安定に生育
- 処理後に投入細菌の回収が容易
⇒ 二次汚染(残留)を防止
- 細菌が植物の生育を促進する



分解微生物を植物に付着させることにより、
光エネルギーによる省エネ型環境浄化が可能

＜除菌ウキクサへの根圏細菌再付着の様子＞



0 時間

OD₆₀₀ = 0.3

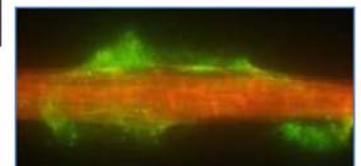


72 時間後

OD₆₀₀ = 0.03 - 0.05

注) OD₆₀₀ : 600 nm濁度 = 浮遊細菌数の指標

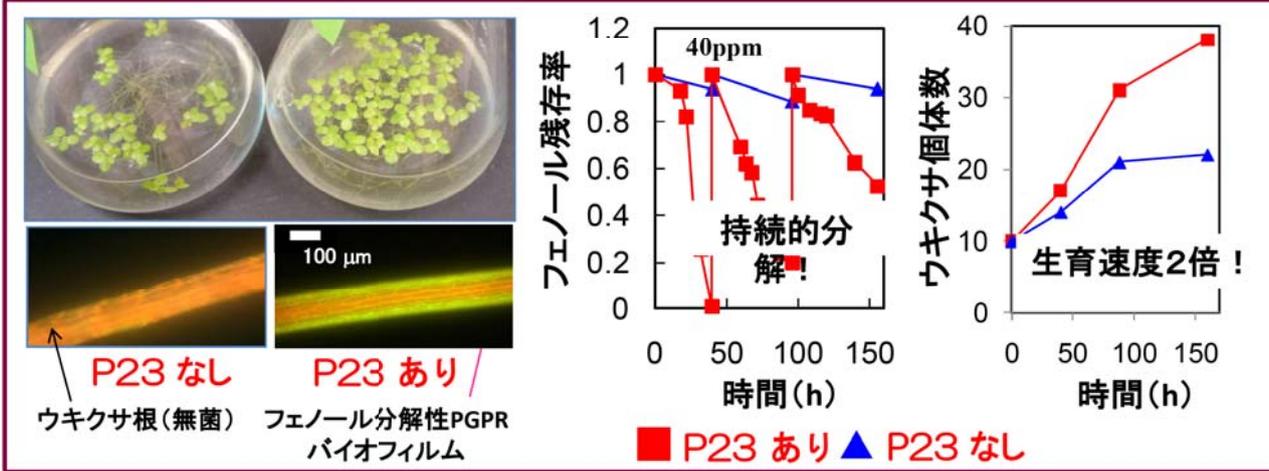
根圏バイオフィルム



100 μm

ウキクサ根表面を有用根圏細菌で優先化させる技術を確立した

根圏バイオフィルム工学により、持続的水質浄化と植物の生育促進を同時に実現することに成功(世界初!)
Acinetobacter calcoaceticus P23



P23 : 植物生育促進菌 (PGPR) かつ 炭化水素類分解菌 & 回収可能 (二次汚染なし)

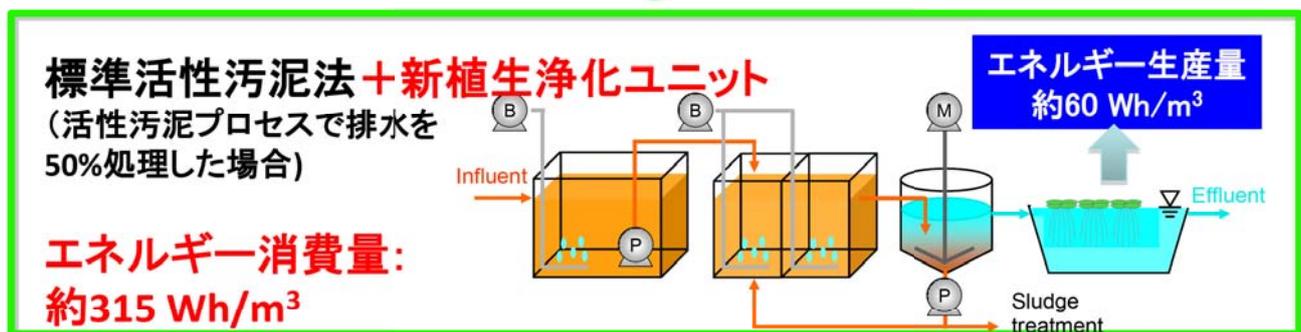
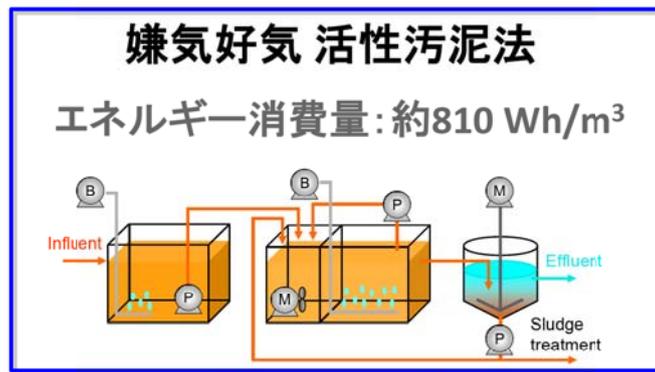
「新規水草根圏微生物」
特願2008-099213号

Yamaga F, Washio K, Morikawa M. (2010)

Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6470-6474+

4. 実用化の見通しについて (1) 成果の実用化可能性

項目3 ~ ケース1 : 省エネルギー型高効率栄養塩除去システム~



項目 3～ケース 2：二次処理水の水質安定化～

日本の工場廃水仕上げ処理

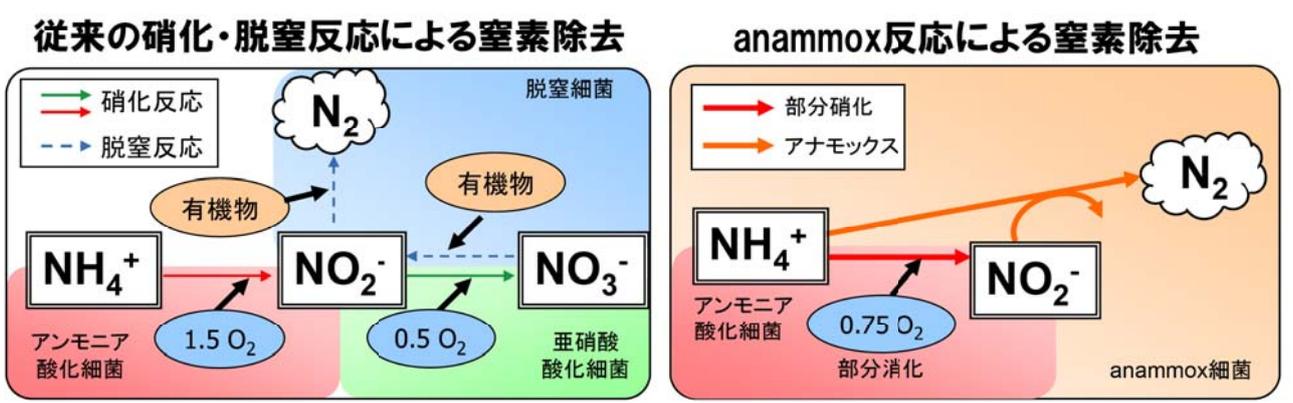


研究開発テーマ

嫌気性アンモニア酸化(anammox)プロセスを軸とした 高効率・省エネルギー、低コスト型窒素除去システム の開発

北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門
岡部 聡

開発概要(従来の課題と本技術の新規性)



- ◆ anammox反応から温室効果ガス(N_2O ガス)は発生しない。
- ◆ 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

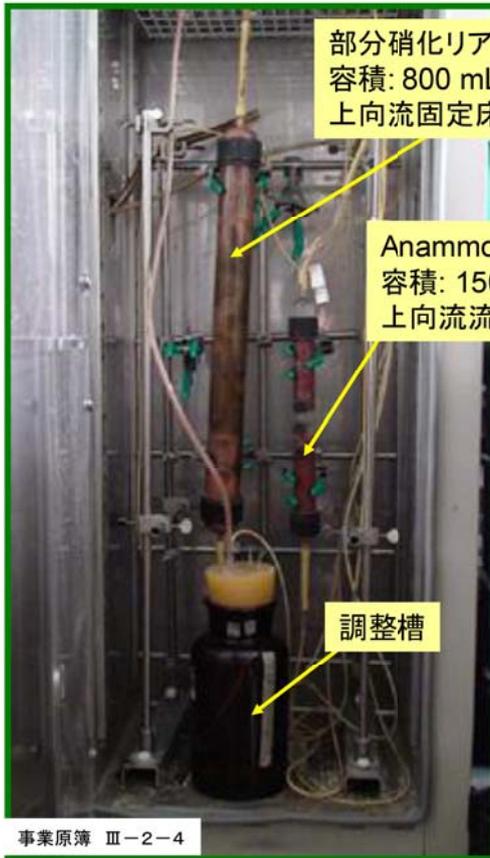
- ①人工廃水を処理する部分硝化－anammox並列リアクターの開発
- ②部分硝化プロセスの最適条件の検討
- ③Anammoxプロセスの最適条件の検討
- ④分子生物学的手法およびマイクロセンサーによる微生物群集解析
- ⑤Anammox細菌のメタゲノム解析(平成20年度の加速予算)
- ⑥実廃水を用いた実証試験(anammoxプロセスのみ)



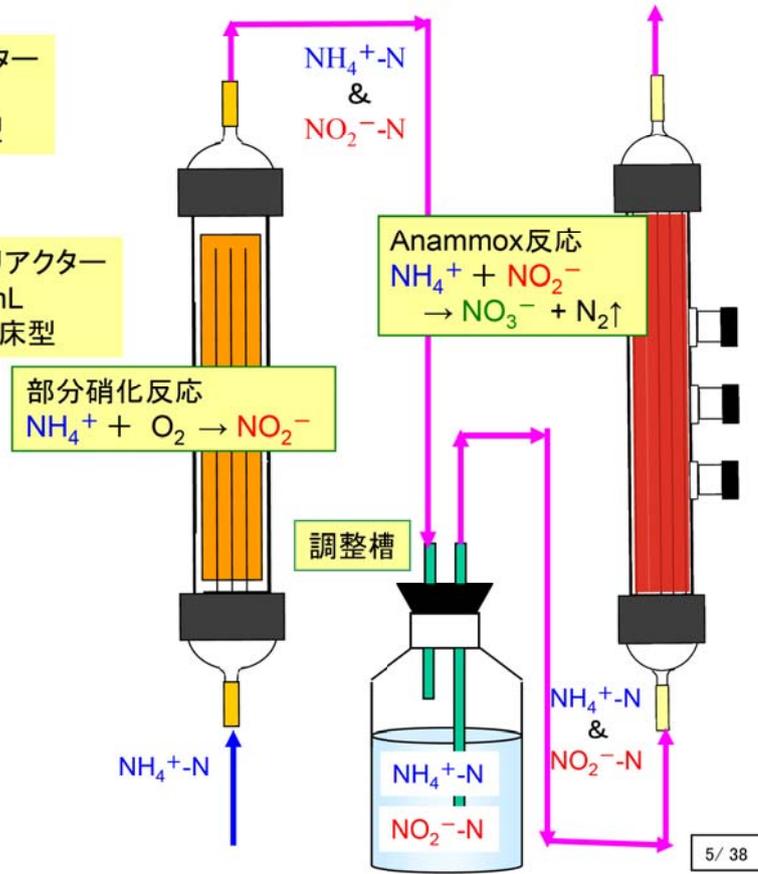
①人工廃水を処理する部分硝化－anammox並列リアクターの開発

①人工廃水を処理する部分硝化—anammoxリアクターの開発

公開



事業原簿 Ⅲ-2-4

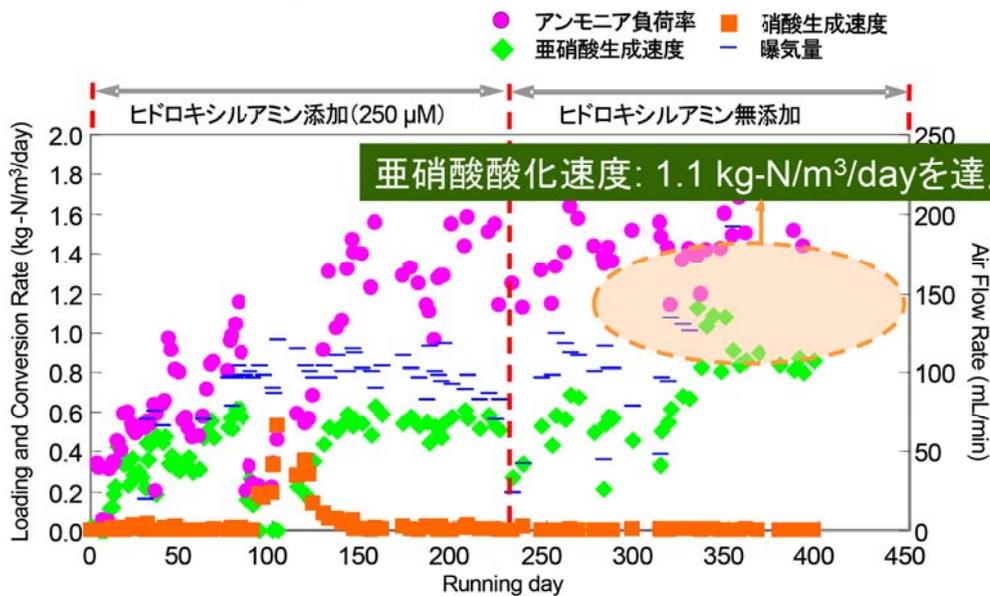


5/38

②部分硝化プロセスの最適条件の検討

公開

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、
◆ 安定的な部分硝化プロセスの構築に成功

事業原簿 Ⅲ-2-4

6/38

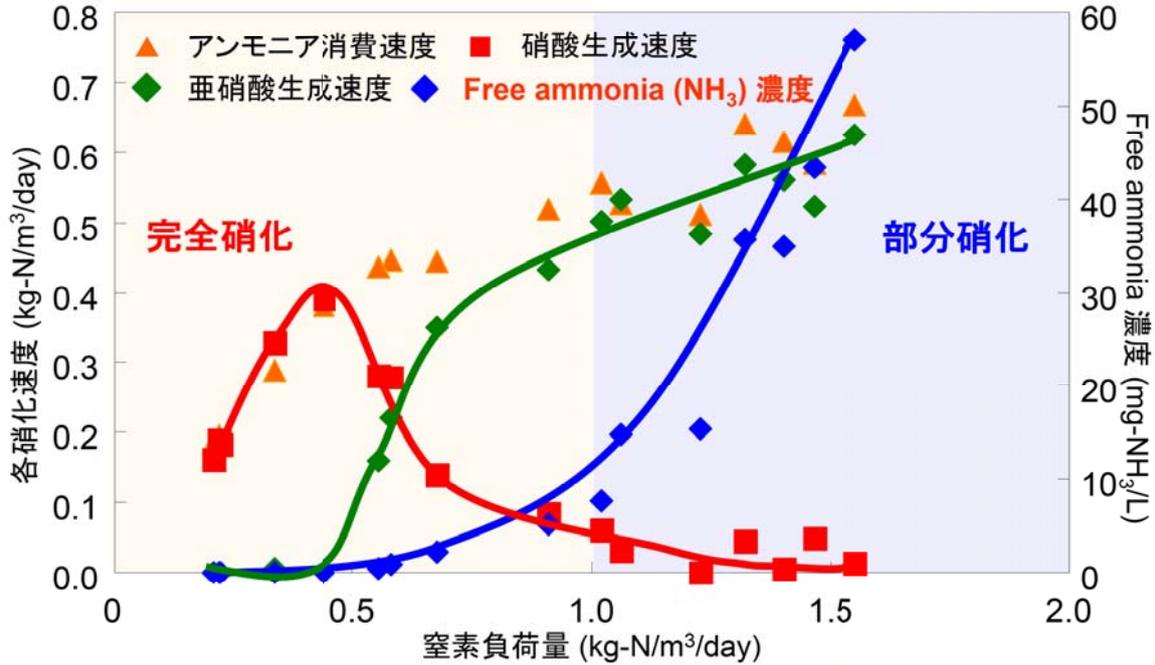
②部分硝化プロセスの最適条件の検討

公開

窒素負荷量と部分硝化性能との対応

NH_3 :NOBの活性を抑制

(Anthonisen et al., 1976)



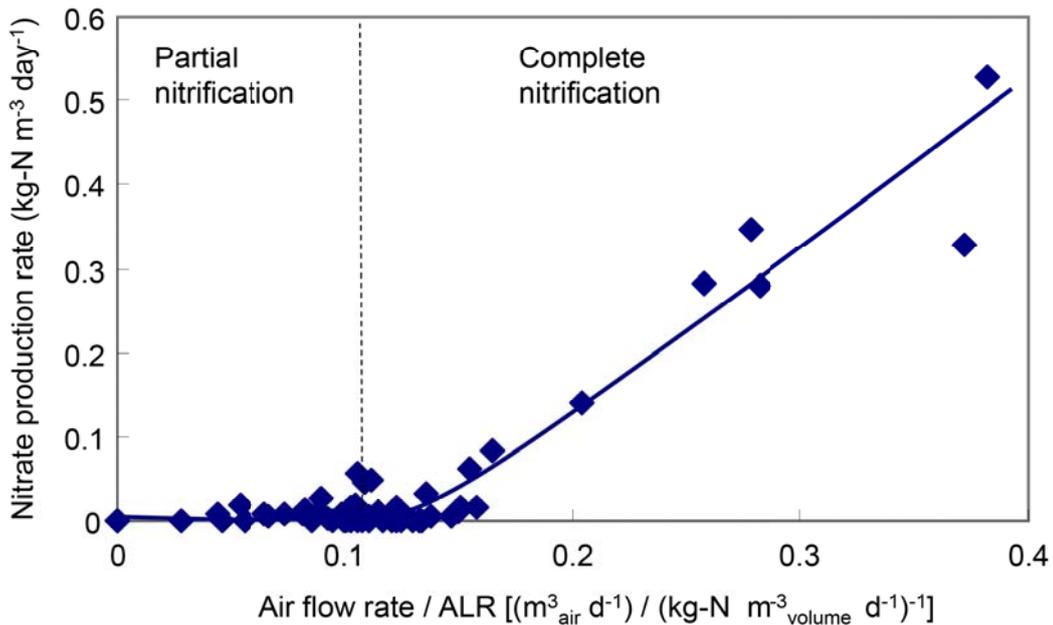
窒素負荷量を高負荷に設定 → NH_3 濃度の上昇 → 部分硝化の安定化

事業原簿 Ⅲ-2-4

7 / 38

②部分硝化プロセスの最適条件の検討

公開



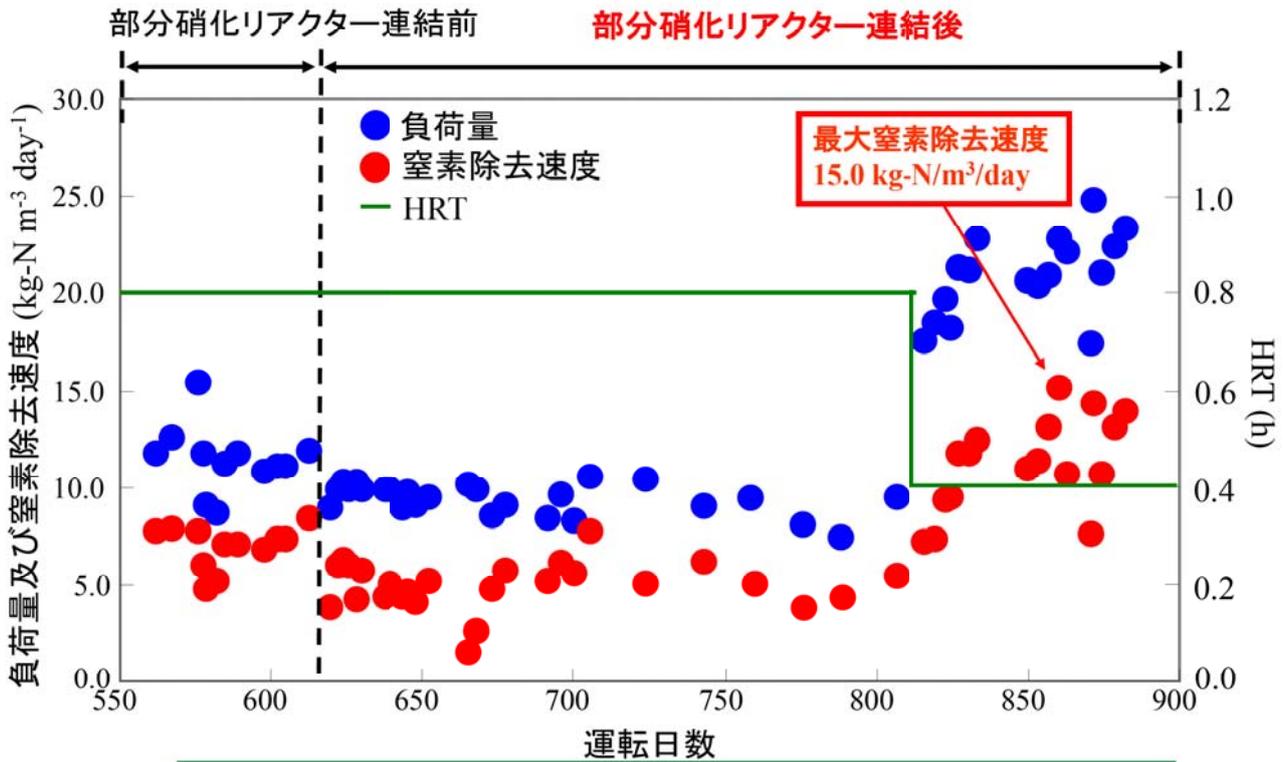
Okabe et al., (2011) Bioresource Tech.

事業原簿 Ⅲ-2-4

8 / 38

③ Anammoxプロセスの最適条件の検討

公開



部分硝化-anammoxプロセスにおいて
最大窒素除去速度 $15.0 \text{ kg-N/m}^3_{\text{anammox reactor}}/\text{day}$ を達成

事業原簿 Ⅲ-2-4

9/38

① 人工廃水を処理する部分硝化-anammoxリアクターの開発

公開

| Process type | Reactor | Substrate | Removal rate ($\text{kg-N/m}^3/\text{day}$) | References |
|--------------------------|------------|--------------------------------|--|------------------------|
| 二槽型 部分硝化 -anammox | CSTR-FBR | Anaerobic digester supernatant | 0.71 | Jetten et al. 1997 |
| | CSTR-FBR | Anaerobic digester liquor | 0.75 | Van Dongen et al. 2001 |
| | CSTR-FBR | Anaerobic digester supernatant | 2.4 | Fux et al. 2002 |
| | Gas-lift | Anaerobic digester supernatant | 9.5 | Wouter. et al. 2007 |
| 単一槽型 部分硝化 -anammox | RDC | - | 0.6 | Hippen et al. 1997 |
| | RDC | - | 0.4 | Siegrist et al. 1998 |
| | SBR | Synthetic | 0.11 | Third et al. 2001 |
| | Gas-lift | Synthetic | 0.064 | Sliekers et al. 2002 |
| | Gas-lift | Synthetic | 1.5 | Sliekers et al. 2003 |
| | RDC | - | 1.7 | Schmid et al. 2003 |
| | Moving bed | - | 1.0 | Thole et al. 2005 |
| | UASB | Anaerobic digester liquor | 0.08 | Ahn et al. 2006 |
| | SBR | - | 0.6 | Wett et al. 2006 |
| | SBR | - | 0.4 | Nyhuis et al. 2006 |
| Moving bed | - | 0.5 | Szatkowska et al. 2007 | |

CSTR; continuously stirred tank reactor, FBR; fluidized bed reactor
RDC; rotating disk contactor, SBR; sequencing batch reactor
UASB; upflow anaerobic sludge blanket reactor

本研究における最大窒素除去速度 $15.0 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ → 既往の報告 ($9.5 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$) を上回る窒素除去速度を達成

事業原簿 Ⅲ-2-4

10/38



②部分硝化プロセスの最適条件の検討

事業原簿 Ⅲ-2-4

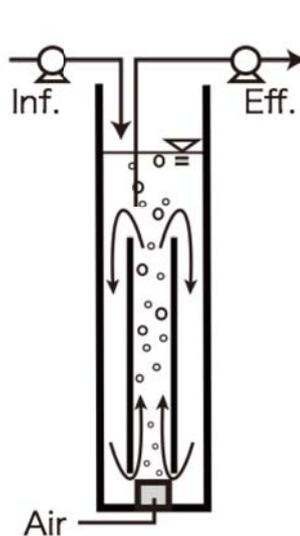
11 / 38

②部分硝化プロセスの最適条件の検討

公開

部分硝化SBR

運転条件



- ◆ 容積: 2.5L
- ◆ 温度: 水温 (8-20°C)
- ◆ HRT: 8時間, 汚泥引き抜き無し
- ◆ 合成培地:
- ◆ NH_4^+ : 200 or 450mgN L⁻¹
- ◆ CH_3COOH : 180 mgC L⁻¹
- ◆ 窒素負荷: 1.25-2.5 kgN m⁻³ day⁻¹
- ◆ 種汚泥: MBR余剰汚泥
- ◆ DO: < 2mgO L⁻¹
- ◆ pH: 制御無し

基質供給: 2 min
 好気処理: 231 min
 汚泥沈降: 5 min
 放流: 2 min

タイムシーケンス



事業原簿 Ⅲ-2-4

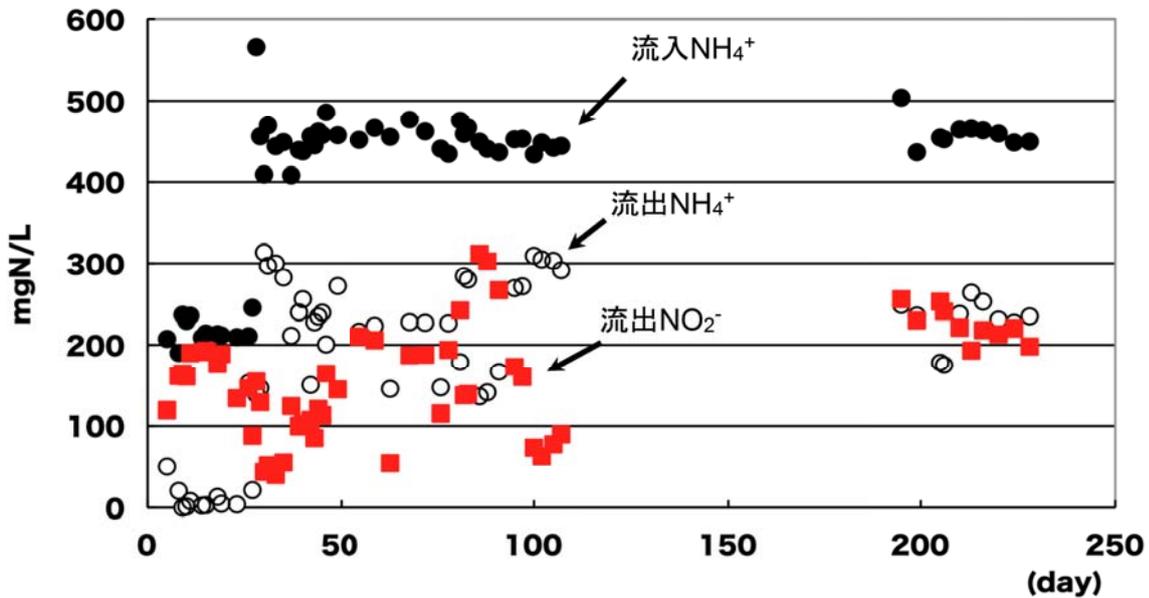
12 / 38

②部分硝化プロセスの最適条件の検討

公開

部分硝化リアクタの運転性能: 各態窒素

pH:7.8~8.2、DO: <2 mgO/L



- グラニュールバイオマスが優占化した。
- 迅速な部分硝化反応の立ち上げに成功した。
- 部分硝化速度: $1.25 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 、亜硝酸転換率: 約50%

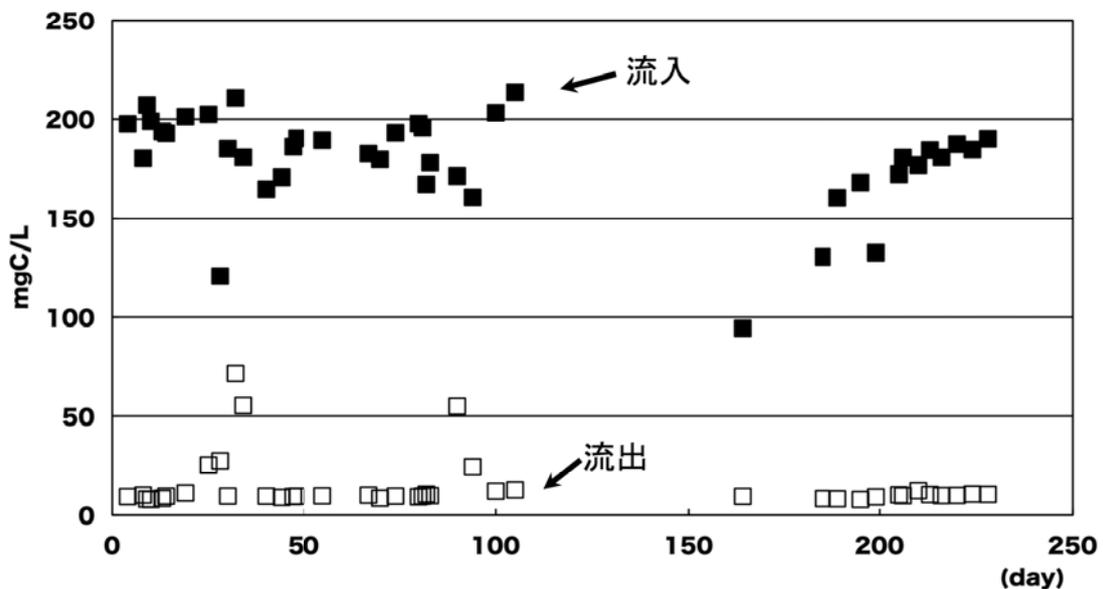
事業原簿 Ⅲ-2-4

13/38

②部分硝化プロセスの最適条件の検討

公開

部分硝化リアクタの運転性能: 有機物除去

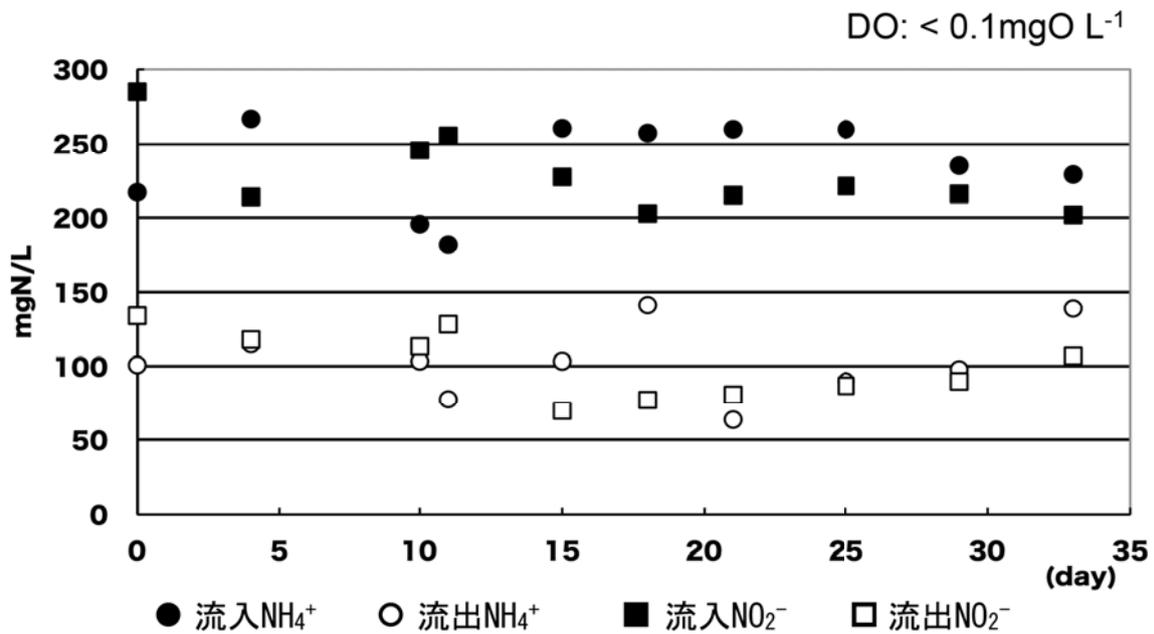


- 部分硝化反応と同時に有機物を除去することができた。
TOC除去率: >90% (水温 8°C~20°C)
- Anammoxプロセスへ供することができる処理水を得た。

事業原簿 Ⅲ-2-4

14/38

Anammoxプロセスとの連結



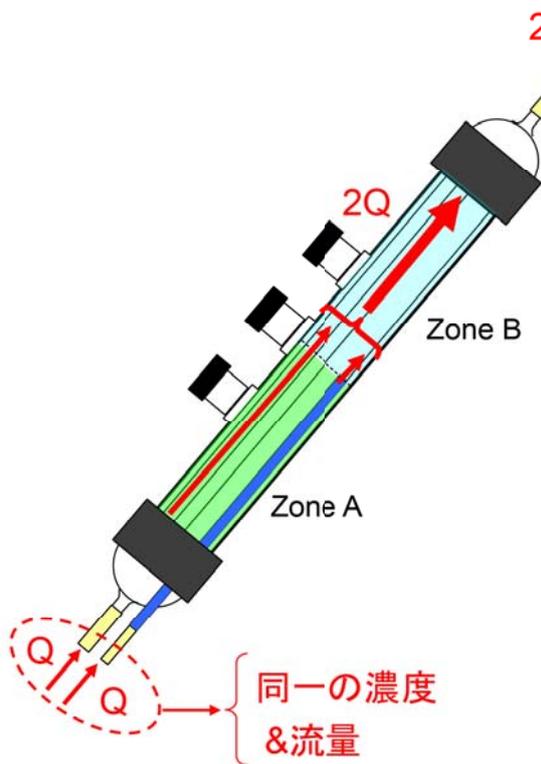
- ▶ 窒素除去率: 4~5割 (高NO₂⁻流入による活性阻害?)
- ▶ Anammoxリアクタにおいて逐次処理が可能であった。



③Anammoxプロセスの最適条件の検討

③Anammoxプロセスの最適条件の検討

公開



運転条件

| HRT (hour) | | |
|-----------------|--------------------------|--------|
| Phase 1 | 0.8 | Normal |
| Phase 2 | 1.6 | Normal |
| Phase 3 | Zone A 1.6 Zone B 0.8 | Step |
| Phase 4 | Zone A 0.8 Zone B 0.4 | Step |
| Phase 5 | Zone A 0.4 Zone B 0.2 | Step |
| Phase 6 | Zone A 0.2 Zone B 0.1 | Step |
| Flow rate ratio | Main: 50% Step: 50% | |
| Influent pH | 7.2±0.1 | |

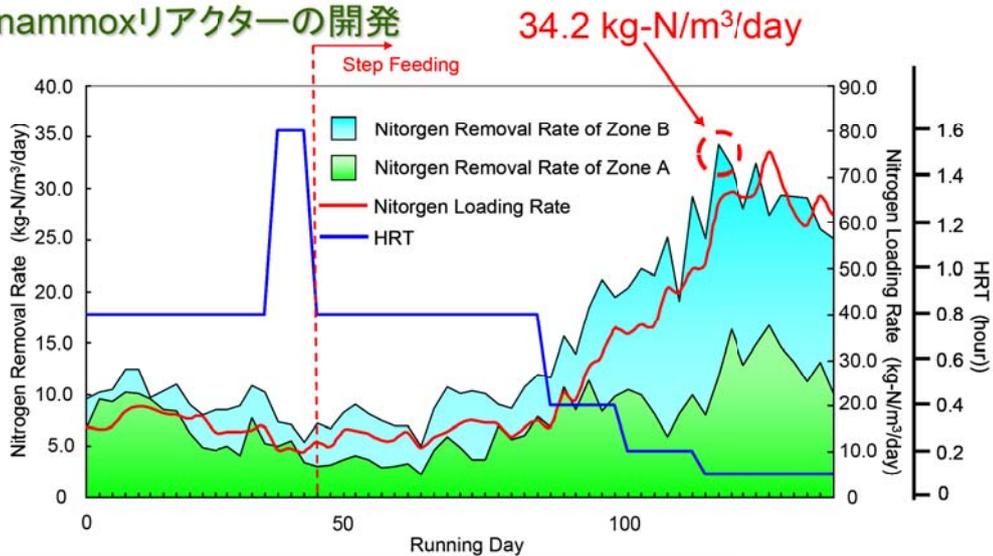
事業原簿 Ⅲ-2-4

17/ 38

③Anammoxプロセスの最適条件の検討

公開

高効率anammoxリアクターの開発



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

既存技術、先行技術に対して“約15倍”の効率化

事業原簿 Ⅲ-2-4

18/ 38



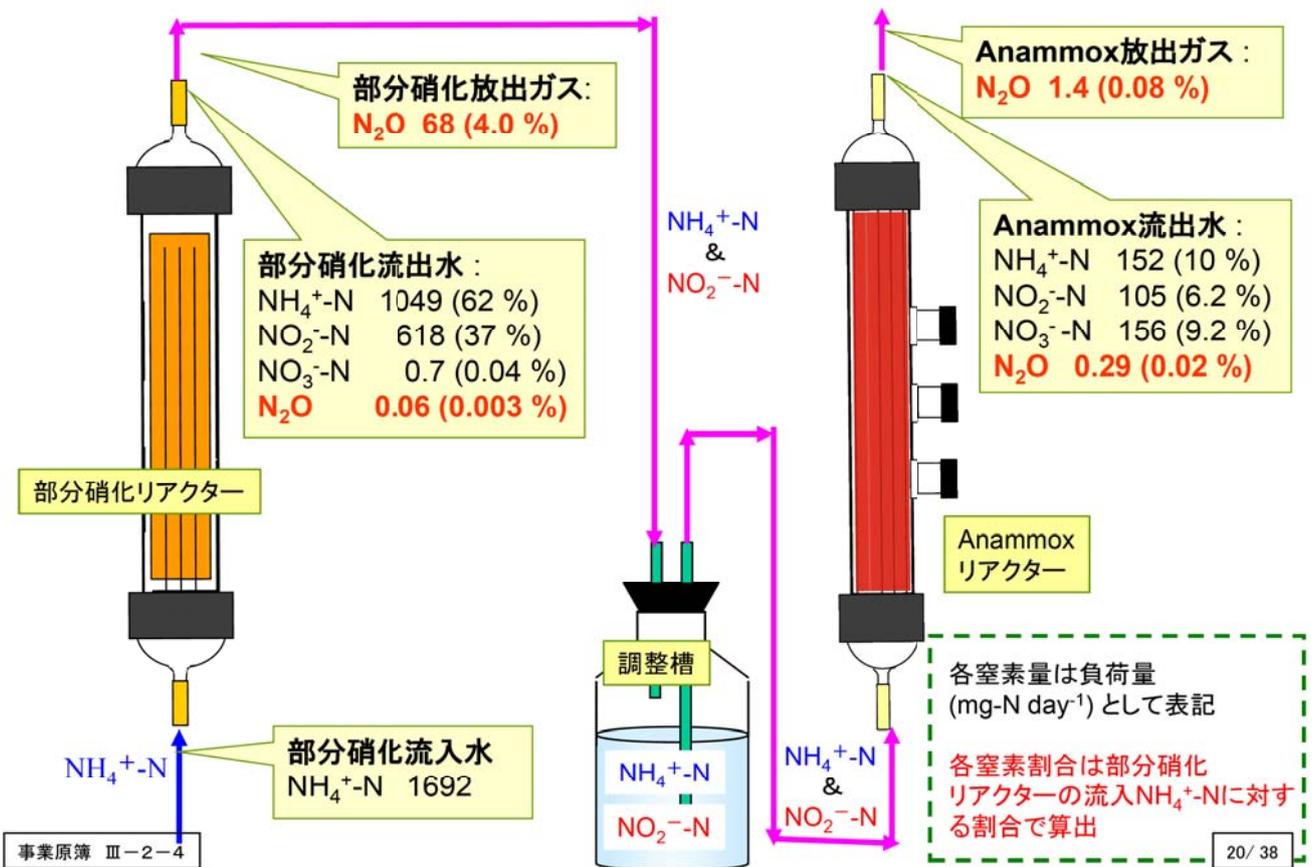
④分子生物学的手法およびマイクロセンサーによる微生物群集解析

事業原簿 Ⅲ-2-4

19/ 38

①部分硝化－anammoxプロセスからのN₂O生成

公開

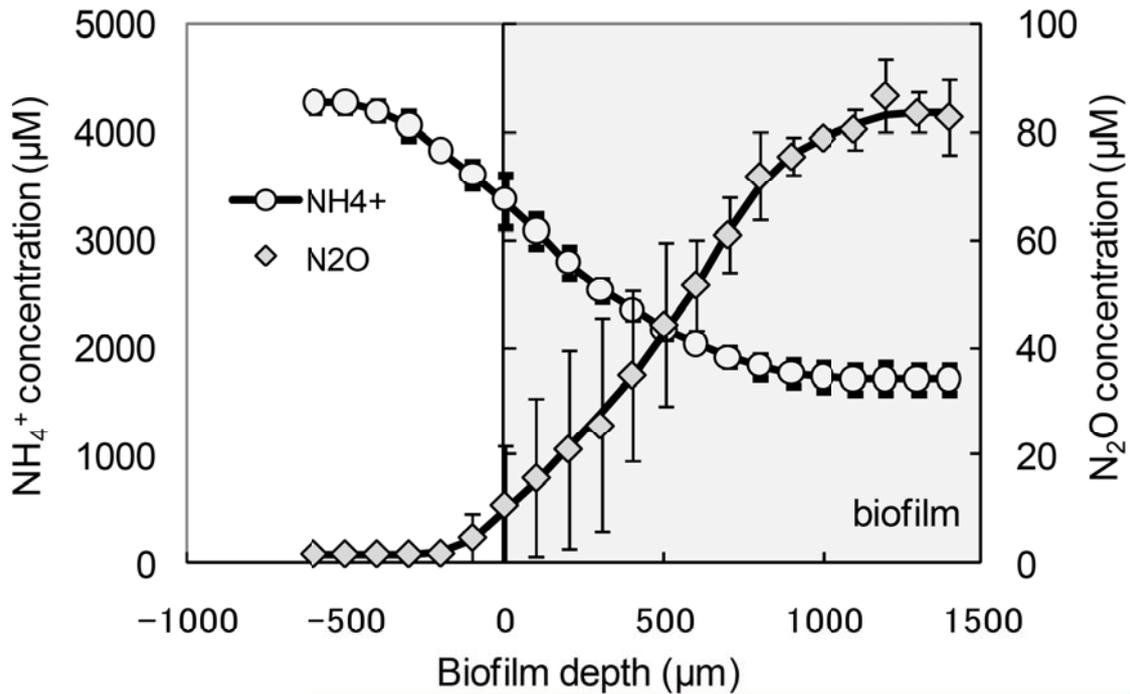


事業原簿 Ⅲ-2-4

20/ 38

④ Anammox グラニューール内の NH_4^+ と N_2O 濃度プロファイル

公開

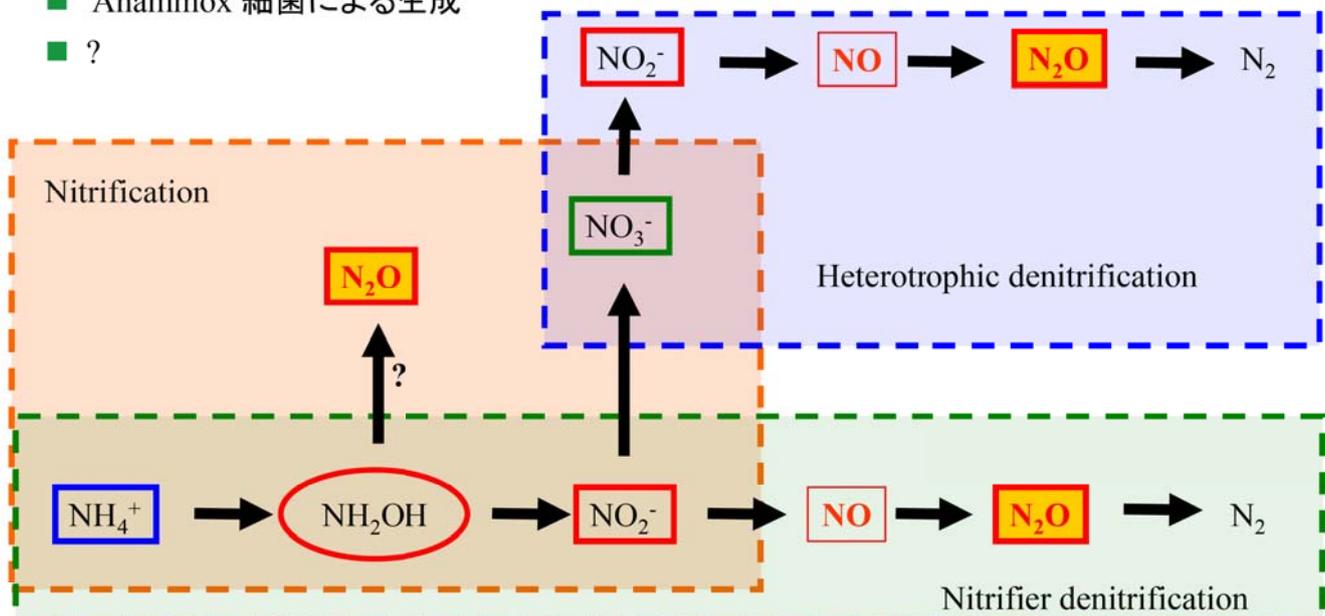


Anammox グラニューール内での NH_4^+ 消費及び N_2O 生成を確認

④ Anammox グラニューール内の NH_4^+ と N_2O 濃度プロファイル

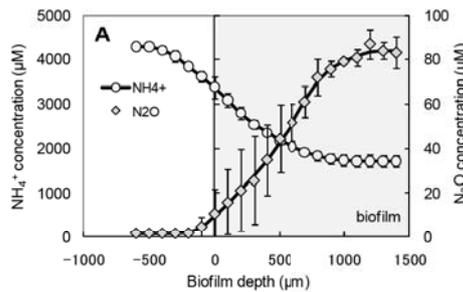
公開

- AOBによる生成 (硝化細菌による脱窒)
- 脱窒細菌による生産
- NH_2OH 酸化過程における NOH の化学的分解
- Anammox 細菌による生成
- ?



④ Anammoxグラニューール内のNH₄⁺消費およびN₂O生成速度

公開



反応速度の算出

- 濃度プロファイルより近似曲線を作成
- Fickの第2法則より算出

NH₄⁺消費反応

生物膜表層 (0 ~ 1000 μm)
付近において確認

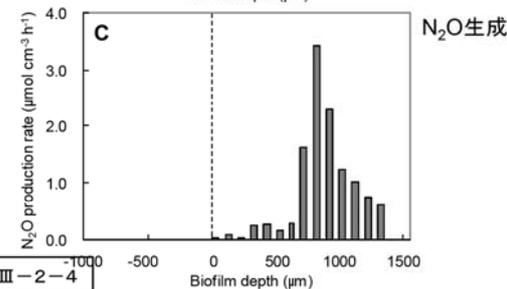
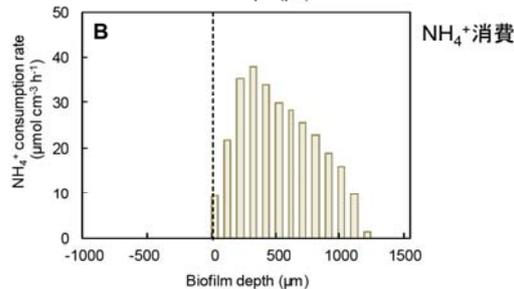


N₂O生成反応

生物膜深層 (600 ~ 1300 μm)
付近において確認

NH₄⁺酸化及びanammox反応に
伴うN₂O発生の可能性が否定

➔ 脱窒反応による発生の可能性



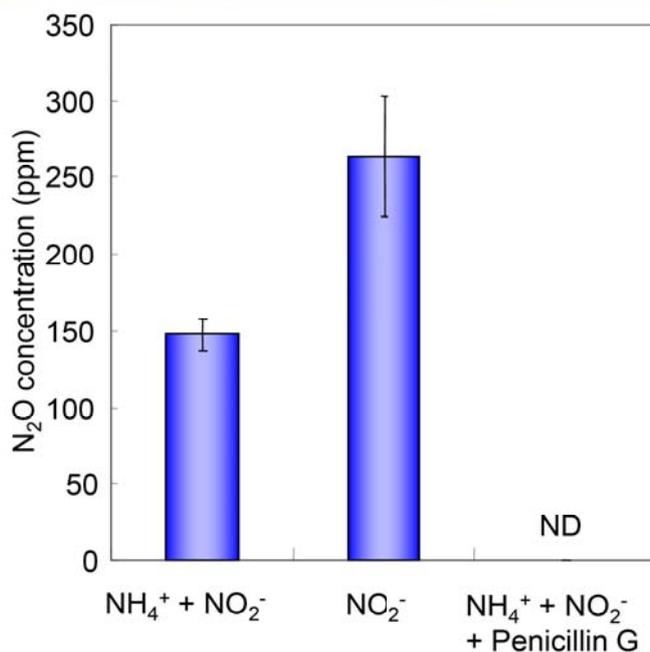
事業原簿 Ⅲ-2-4

23/ 38

④ Anammoxグラニューール内でのN₂O発生源の特定

公開

回分培養試験によるN₂O発生状況の比較



NH₄⁺ + NO₂⁻添加系

活性細菌

- AOB
- Anammox細菌
- 従属栄養性脱窒細菌

NO₂⁻添加系

活性細菌

- 従属栄養性脱窒細菌

NH₄⁺ + NO₂⁻ + Penicillin G添加系

活性細菌

- AOB
- Anammox細菌

Anammoxグラニューール内におけるN₂O生成は
従属栄養性脱窒細菌由来の可能性

事業原簿 Ⅲ-2-4

24/ 38

⑤Anammox細菌のメタゲノム解析

事業原簿 Ⅲ-2-4

25/ 38

⑤Anammox細菌のメタゲノム解析(平成20年度の加速予算)

公開

Ca. 'B. sinica'の生理学的特性

| | <i>B. sinica</i> | <i>B. anammooxidans</i> ** | <i>K. stuttgartiensis</i> *** |
|--|------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Temperature (° C) | 25-45 | 20-43 | 25-37 |
| pH | 7.0-8.8 | 6.7-8.3 | 6.5-9.0 |
| Growth rate (h ⁻¹) | 0.0041 | 0.0027 | 0.0026-0.0035 |
| Biomass yield (mmol-C mmol-N ⁻¹) | 0.063 | 0.07 | ND |
| Affinity for ammonium (mmol) | 28 ± 4 | <5 | ND |
| Affinity for nitrite (mmol) | 86 ± 4 | <5 | 0.2-3 |
| Activation energy (kJ mol ⁻¹) | 56 ± 3 | 70 | ND |
| Protein contents of biomass (g-protein g-VSS ⁻¹) | 0.61 | 0.6 | ND |
| Tolerance | | | |
| Nitrite (mmol) | <16 | 7 | 13, 25 |
| Dissolved oxygen (mmol) | <63 | <1 | 0-200 |
| Phosphate (mmol) | <20 | ND | 20, 21 |

** References; Jetten *et al.* (2005); Strous *et al.* (1998, 1999)*** References; Dapena-Mora *et al.* (2007); Egli *et al.* (2001); van der Star *et al.* (2008)

- 増殖速度が速く、高負荷運転に適している
 - ⇒ Anammoxプロセスの立ち上げの早期化に有望
 - ⇒ 生理学知見をもとに高効率な運転培養技術へ応用

事業原簿 Ⅲ-2-4

26/ 38

⑤Anammox細菌のメタゲノム解析(平成20年度の加速予算)

公開

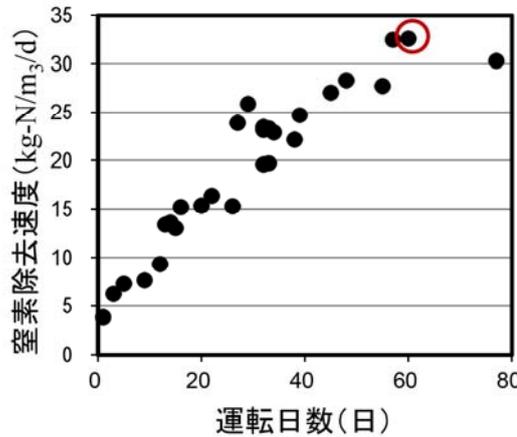
◆高純度・高活性のanammoxリアクタの構築



容積60mL

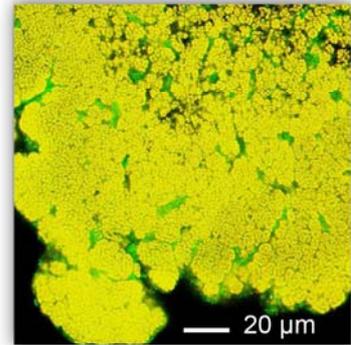
上向流カラム型

| | |
|------------------------------|---------------|
| NH ₄ ⁺ | 50-200 mg-N/L |
| NO ₂ ⁻ | 50-200 mg-N/L |
| 温度 | 37°C |
| HRT | 0.5-0.2 h |



最大窒素除去速度**33kg-/m³/d**
(世界第**3**位)

使用プローブ
(AMX820-EUB338 mix)



黄: *B. sinica* (94%)
緑: 他の細菌

メタゲノム解析、プロテオーム解析に適した
集積度の高いバイオマスを得ることができた

⑤Anammox細菌のメタゲノム解析(平成20年度の加速予算)

公開

DNA 抽出



DNA blood tissue kit (Qiagen)
細胞壁をビーズで破碎
酵素混合溶液を使用
(achromopeptidase, proteinase K,
lysozyme)

シーケンス



GS FLX Titanium (Roche)

アSEMBル



GS De Novo Assembler
version 2.3

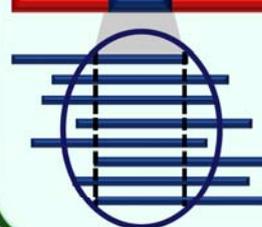
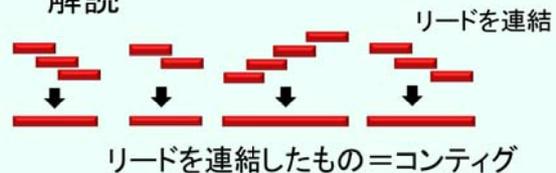
アノテーション

CRITICA、glimmer2

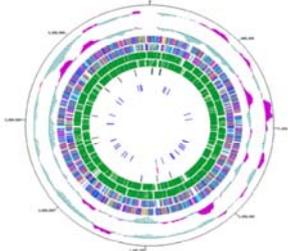
- *K. stuttgartiensis*のゲノム長: 約4Mbp
- *B. sinica*のゲノム長も約4Mbpと仮定

他菌の配列の混入をできるだけ防ぐ

- 総解析塩基数404,863,167 pb
(総リード数1,204,328 bp)
- ゲノム長の約**100**倍の塩基配列を
解読



コンティグの配列のうち、冗長度が**40**以上の部分のみを採用

| | <i>B. sinica</i> | <i>B. sinica</i> genome map | <i>K. stuttgartiensis</i> |
|-------------|------------------|--|---------------------------|
| 総塩基数 (bp) | 4,001,127 |  | 4,218,325 |
| シーケンス冗長度 | 100 | | 22 |
| Contigs | 1 | | 5 |
| G+C 含有率 (%) | 41 | | 41 |
| 予測遺伝子数 | 3,900 | | 4,664 |
| rRNA | 1 × 16S-23S-5S | | 1 × 16S-23S-5S |
| 完成度 | >98% | | >98% |

| 窒素代謝関連遺伝子 | <i>B. sinica</i> | <i>K. stuttgartiensis</i> |
|---|------------------|---------------------------|
| <i>amo</i> (ammonia monooxygenase) | 0 | 0 |
| <i>hao</i> (hydroxylamine oxidoreductase) | 12 遺伝子 | 10 遺伝子 |
| <i>nir</i> (nitrite reductase) | 0 | 5 遺伝子 |
| <i>nar</i> (nitrate reductase) | 15 遺伝子 | 15 遺伝子 |
| <i>nor</i> (nitric oxide reductase) | 2 遺伝子 | 3 遺伝子 |
| <i>nos</i> (nitrous oxide reductase) | 0 | 0 |

完全長に近いゲノム配列の再構築に成功した。
Anammox反応に関与するNIR遺伝子の有無に差が見いだされた。



⑥実廃水を用いた実証試験

⑥実廃水を用いた実証試験 (anammoxプロセスのみ) (平成23年度)

公開

実験装置と運転条件

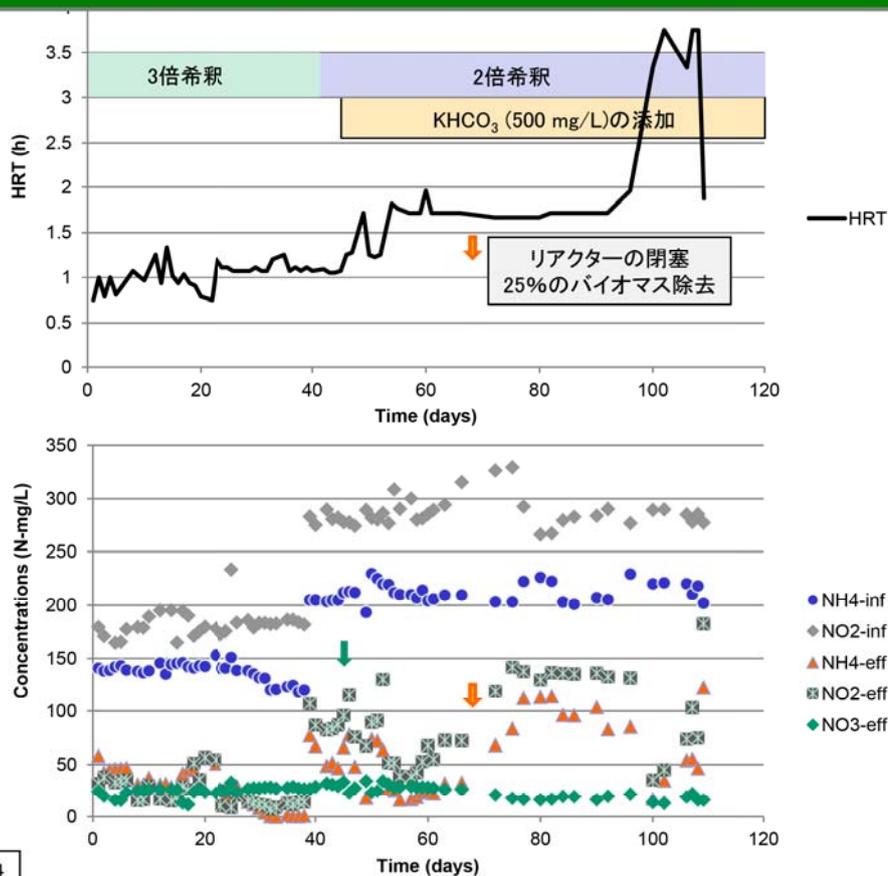
- 上向流カラムリアクター(流動床)、体積 150 mL
(高さ 28 cm, 直径 2.6 cm)
- 温度 38°C
- 使用廃水: Y市汚泥資源化センターの嫌気性消化汚泥脱離液

嫌気性消化汚泥脱離液の水質

| | 濃度 | | 濃度 |
|--------------------|----------|--------------------|----------|
| NH ₄ -N | 434 mg/L | SS | 24 mg/L |
| NO ₂ -N | 578 mg/L | COD _{Mn} | 740 mg/L |
| NO ₃ -N | 1 mg/L | BOD | 64 mg/L |
| TOC | 78 mg/L | PO ₄ -P | 42 mg/L |
| IC | 65 mg/L | T-P | 41 mg/L |

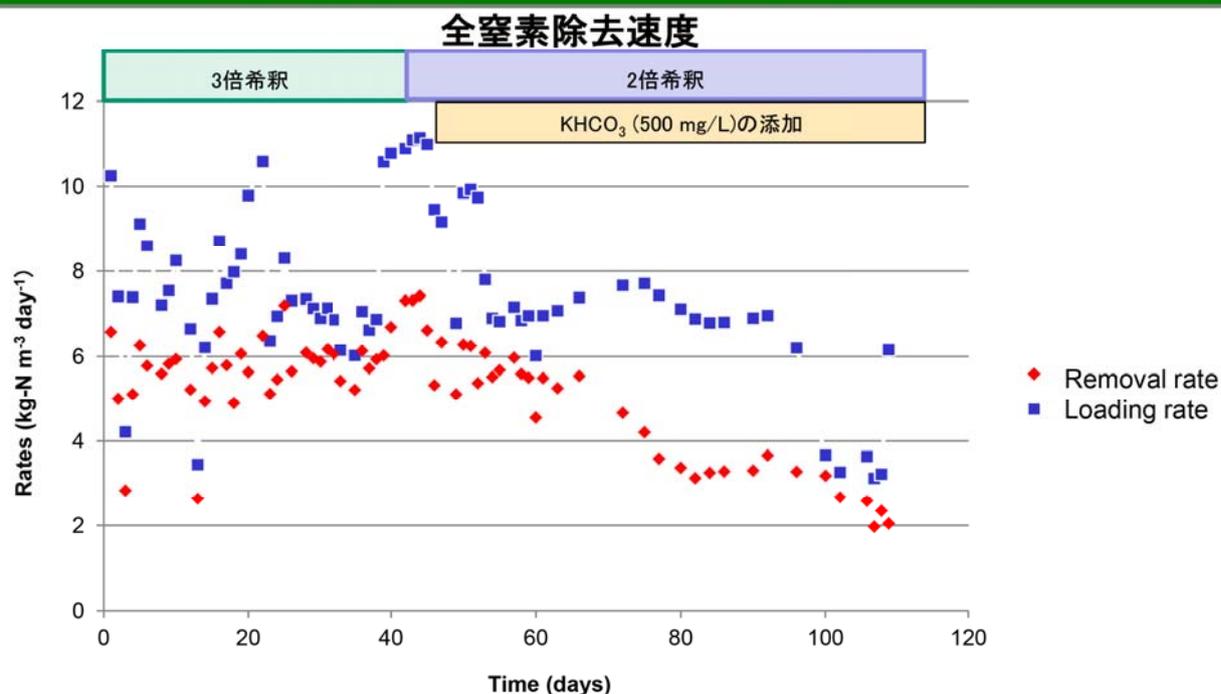
⑥実廃水を用いた実証試験 (anammoxプロセスのみ) (平成23年度)

公開



⑥実廃水を用いた実証試験 (anammoxプロセスのみ) (平成23年度)

公開



嫌気性消化汚泥脱離液をanammoxプロセスで処理し、窒素除去速度約6.0 kg-TN m⁻³ day⁻¹を達成した。

⑥実廃水を用いた実証試験 (anammoxプロセスのみ) (平成23年度)

公開



運転開始13日目



運転開始111日目



最終目標(基本計画の値)の達成度

公開

| 研究項目 | 概要(最終目標の達成度) |
|----------------------------------|---|
| 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15.0 Kg-TN/m ³ /dを達成した。(達成率100%) |
| 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硝化反応を立ち上げることに成功した。(達成率100%) |
| 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部分硝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 | ⑤Ca. B. sinicaの完全長に近いゲノム配列の再構築に成功した。プロテオーム解析を行い、新規窒素代謝経路を発見した。(達成率150%) |
| ⑥実廃水を用いた実証試験(anammoxプロセスのみ) | ⑥消化汚泥脱離液をanammoxプロセスで処理した。窒素除去速度約6.0 kg-TN m ⁻³ day ⁻¹ を達成した。(達成率100%) |

37/38

5年間の研究成果の公表

公開

I. 学術論文5編+2編(投稿準備中)

1. Oshiki, M., et al., Metagenomic analysis of *Candidatus Brocadia sinica*. in preparation
2. Okabe, S., et al., Cell density dependent anammox activity of *Candidatus Brocadia sinica*. in preparation
3. Okabe, S., Oshiki, M., Takahashi, Y., and Satoh, H. (2011) N₂O emission from a partial nitrification-anammox process and identification of a key biological process of N₂O emission from anammox granules. *Water Research*, 2011, **45**(19), 6461-6470.
4. Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H., and Okabe, S. (2011) Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium '*Candidatus Brocadia sinica*'. *Microbiology*, 2011, **157**, 1706-1713.
5. Okabe, S., Oshiki, M., Takahashi, K., and Satoh, H. (2011) Development of long-term stable partial nitrification and subsequent anammox process. *Bioresource Technology*, 2011, **102**(13), 6801-6807.
6. Cho, S., Fujii, N., Lee, T., and Okabe, S. (2011) Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor. *Bioresource Technology*, **102**(2), 652-659.
7. Cho, S., Takahashi, Y., Fujii, N., Yamada, Y., Satoh, H., and Okabe, S. (2010) Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. *Chemosphere*, **78**, 1129-1135.
8. 高橋 慶考、對馬 育夫、下川 正貴、岡部 聡 (2007) 二段ステップ流入式上向流型anammoxリアクターにおける処理性の評価、環境工学論文集, 44, 201-206

II. 国際学会発表7編

1. Okabe, S., Supper high-rate nitrogen removal by a partial nitrification and anammox process. The 8th JST, NSFC Japan-China workshop on "Technology for water pollution prevention" Kyoto Japan, Nov. 14-16, 2011. (**Invited speaker**)
2. Oshiki, M., Satoh, H., and Okabe, S., Long-term operation of anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in a membrane bioreactor equipped with hollow fibred membranes. The 4th IWA-ASPIRE. Tokyo International Forum, Tokyo, Japan. Oct. 2-6, 2011. 13.
3. Okabe, S., N₂O emission from a partial nitrification-anammox process. The 2nd International Conference on Nitrification and the 16th European Nitrogen Cycle Meeting. Berg en Dal, The Netherlands. July 3-7, 2011. (**Invited speaker**)
4. Oshiki, M., Shinyako, K., Satoh, H., and Okabe, S., Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium '*Candidatus Brocadia sinica*', responsible for high-rate nitrogen removal. The 2nd International Conference on Nitrification and the 16th European Nitrogen Cycle Meeting. Berg en Dal, The Netherlands. July 3-7, 2011. (**優秀発表賞**)
5. Oshiki, M., Shinyako, K., Satoh, H., and Okabe, S., Comparative genomics and functional analysis for anammox bacteria, *Candidatus Brocadia sinica* and *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*. First International anammox Symposium 2011 (IANAS2011). Kumamoto, Japan. May 20th, 2011. (**優秀発表賞**)
6. Okabe, S. In situ activity and spatial organization of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in biofilms. IWA Biofilm Technologies Conference, Singapore. January 8-10, 2008
7. Okabe, S., Ogasawara, Y., and Kindaichi, Y. In situ activity and spatial organization of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in biofilms. The 4th American Society for Microbiology Conference on Biofilms, Quebec, Canada. March 25-29, 2007 (**Invited lecture**)

デザイン化微生物群を用いた高効率固定床式 メタン発酵の研究開発

(2007年度～2011年度 5年間)

プロジェクトの詳細 (公開)

NEDO バイオテクノロジー・医療技術部

委託先 財団法人電力中央研究所(共同実施先 東京大学)

事業原簿 Ⅲ-2-5

1/11

3. 成果の詳細

公開

開発目標(最終目標)

廃棄物系バイオマス

食品残渣:2200万トン
(未利用分食品残渣:1760万トン)

バイオマス・ニッポン総合戦略(2006.3)

主流の処理法(焼却)からメタン発酵処理適用による省エネ効果

従来課題

- ・固形廃棄物の処理では、高負荷条件でのメタン発酵の安定性に難
- ・メタン発酵に関与する微生物群を制御する技術(手法)が少ない

技術開発

固定床(担体)メタン発酵による安定化と電気による微生物群の制御技術の
開発、およびこれらの組合せによる効率的なメタン発酵処理技術の開発

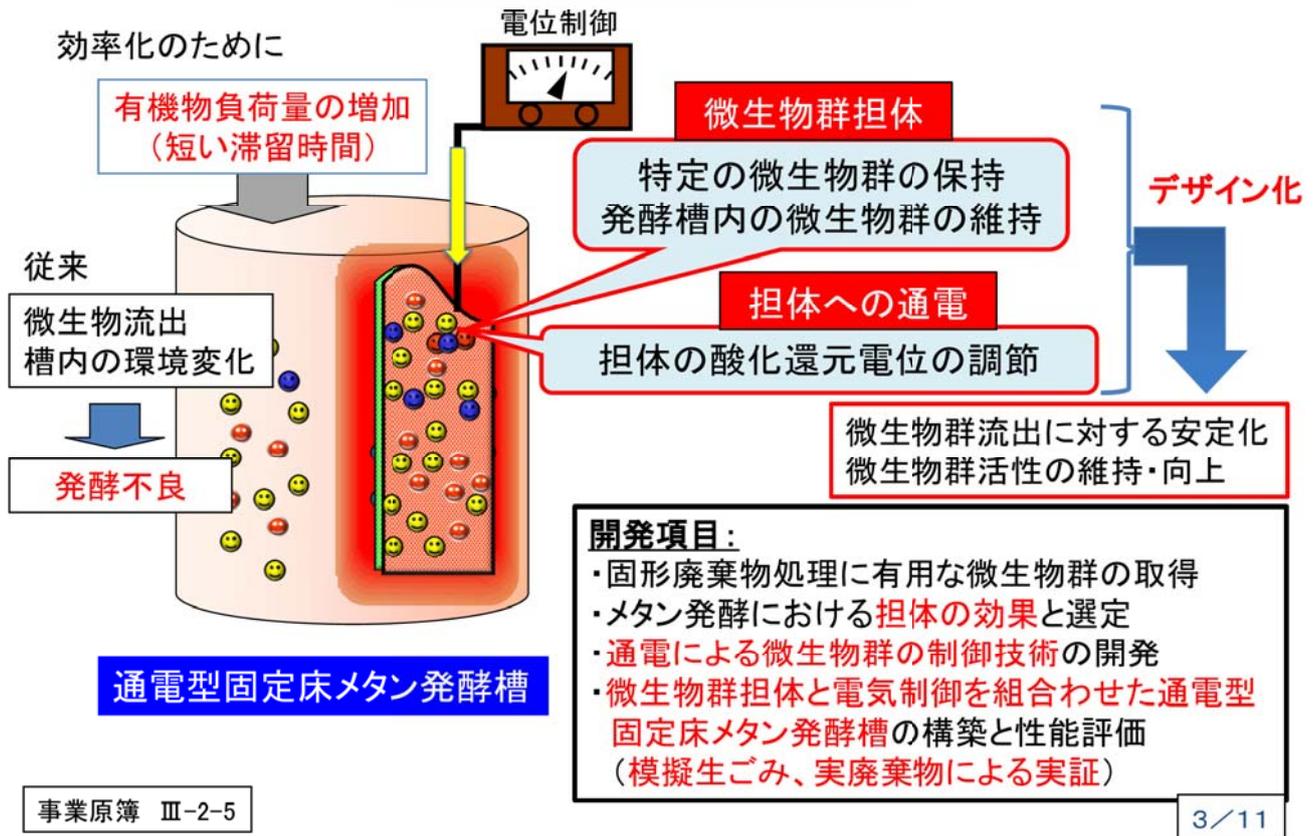
研究開発目標:

- ・生ごみなど固形廃棄物処理へのメタン発酵の適用
- ・従来のメタン発酵槽に比べて、約3倍の容積効率(負荷量:25.5gCOD/L/日)、
設置面積を約50%にコンパクト化することによるシステム効率の向上

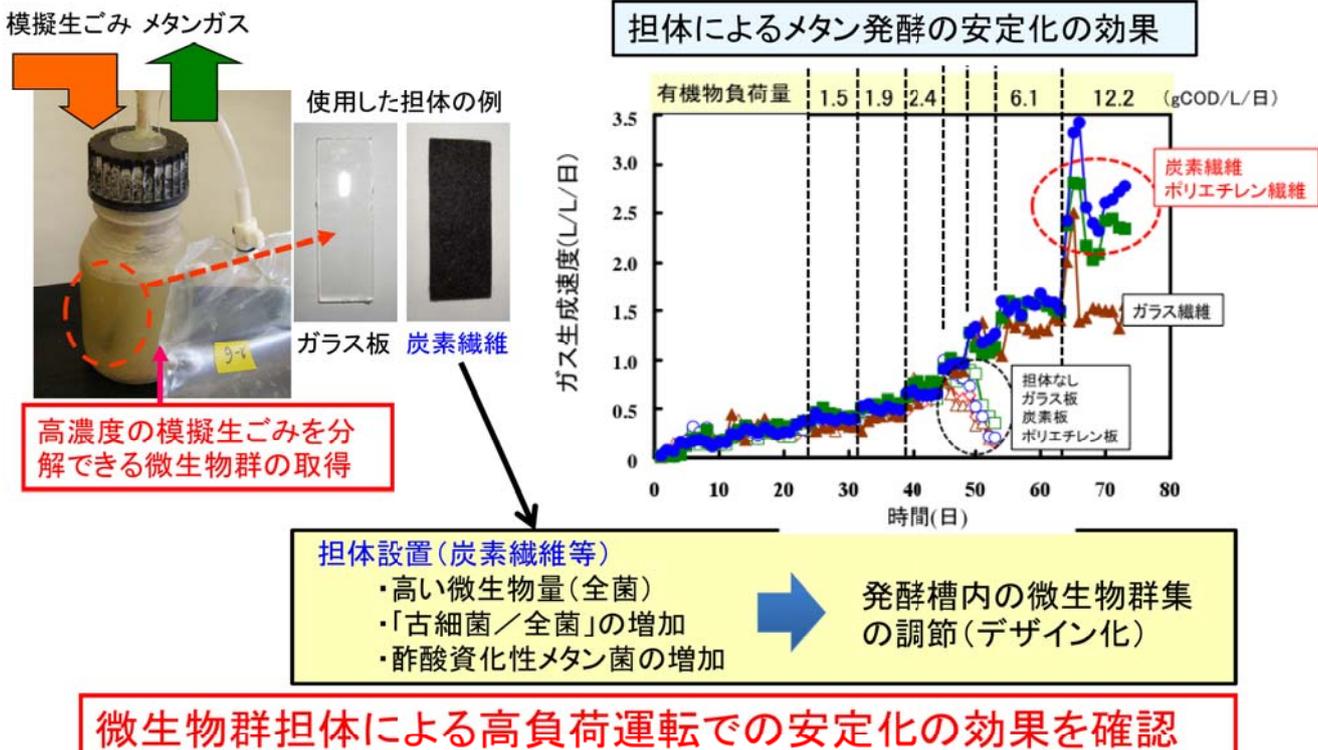
事業原簿 Ⅲ-2-5

2/11

アプローチと開発項目

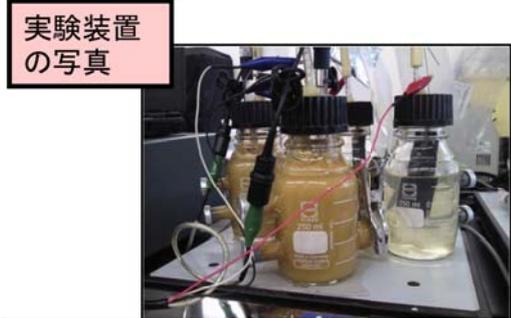
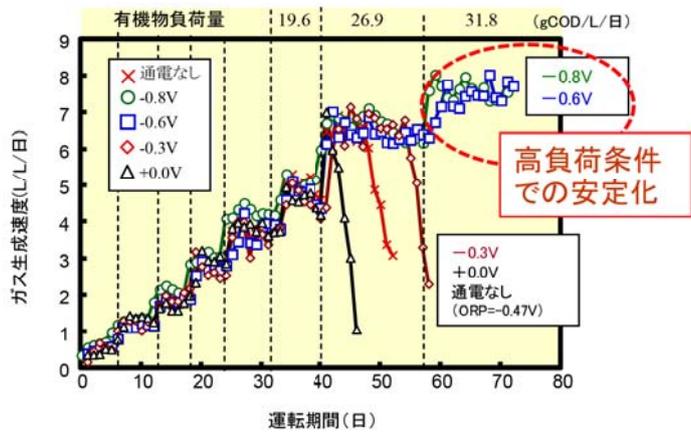
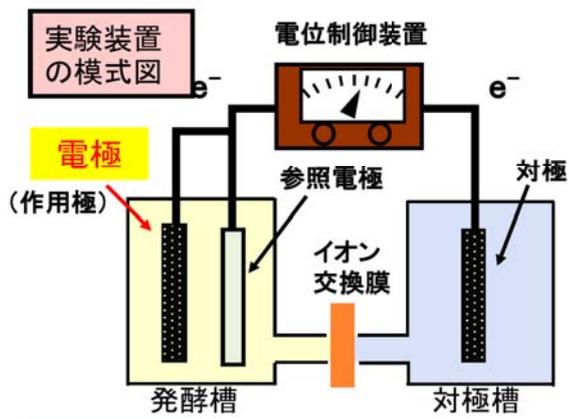


有用微生物群取得と微生物群担体による高負荷条件での安定化



3. 成果の詳細

電気による微生物群の制御による高負荷条件での安定化



発酵槽内に設置した電極への通電による制御

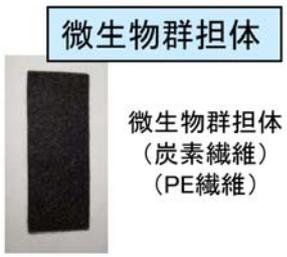
通電による効果 (-0.6V ~ -0.8V)

- ・メタンガス生成能力の維持
- ・有機物除去能力の維持

高負荷条件での安定化に効果を確認

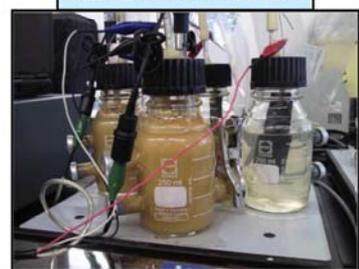
3. 成果の詳細

微生物群担体と通電による制御を組み合わせた発酵槽の構築

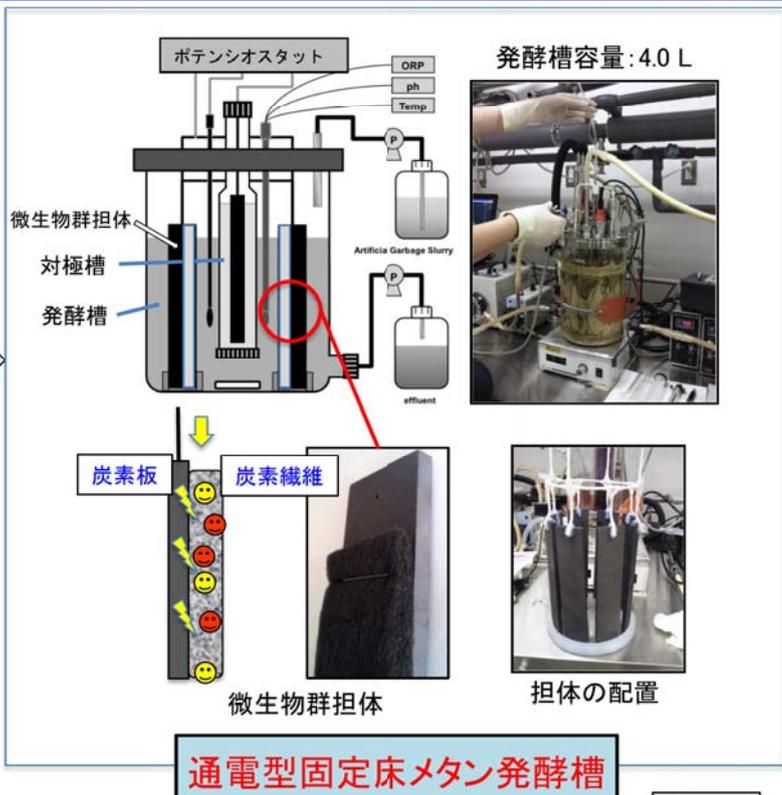


固定床メタン発酵槽 + 通電による制御

デザイン化



通電型メタン発酵槽

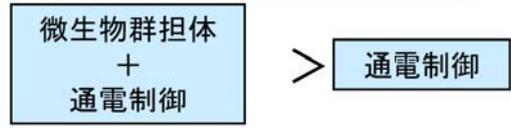


通電型固定床メタン発酵槽

3. 成果の詳細

通電型固定床メタン発酵槽の評価(模擬生ごみ)

有機物負荷に対する安定性

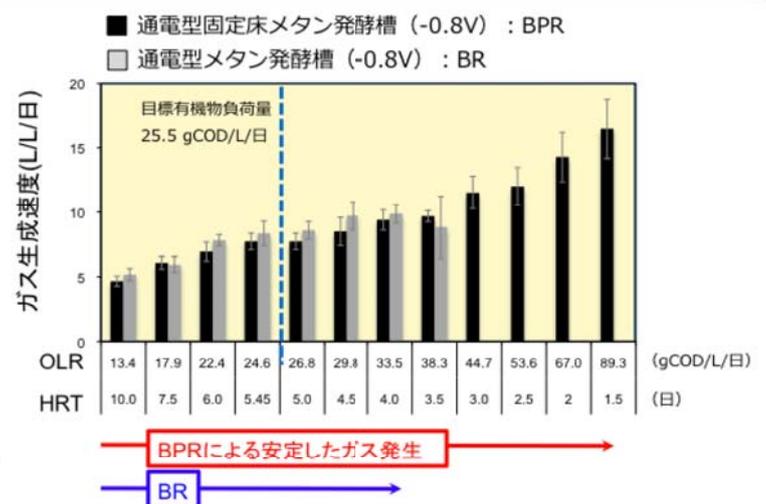


研究目標
既設の3倍の負荷量
有機物負荷量: 25.5gCOD/L/日

通電型固定床メタン発酵槽
最大有機物負荷量: 約89gCOD/L/日
(水理的滞留時間: 1.5日)

目標有機物負荷量以上の処理に成功

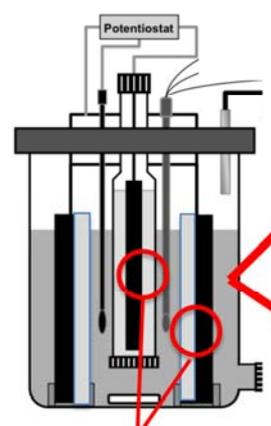
事業原簿 III-2-5



| | 最短滞留時間 (日) | 最大許容負荷量 (gCOD/L/日) | ガス生成速度 (L/L/日) | COD除去率 (%) | SS除去率 (%) |
|------------------------|------------|--------------------|----------------|------------|-----------|
| 通電型固定床メタン発酵槽 (-0.8V) | 1.5 | 89.3 | 16.5 | 62.5 | 52.5 |
| 通電型メタン発酵槽 (-0.8V) | 4.0 | 33.5 | 9.9 | 65.6 | 55.6 |
| 250mL通電型メタン発酵槽 (-0.8V) | 4.5 | 31.8 | 7.6 | 58.2 | 40.0 |
| 250mLメタン発酵槽 (通電なし) | 6.3 | 19.6 | 5.0 | 68.1 | 35.3 |

3. 成果の詳細

通電型固定床メタン発酵槽内の微生物群集評価(模擬生ごみ)

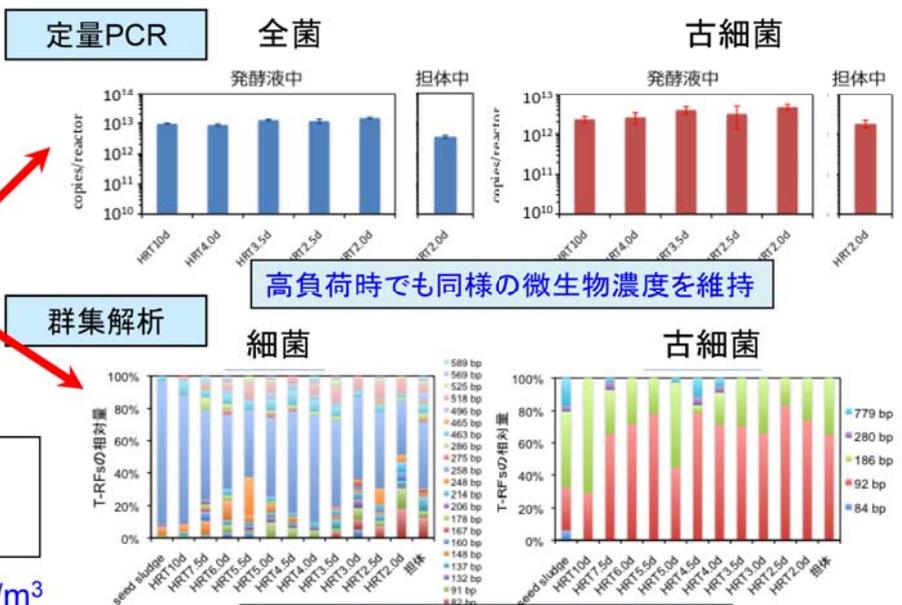


電極間
電流値: 約6.3 mA/reactor
電圧: 約1.8 V (1.7~1.9V)

容積当たりの電力: 約6.2W/m³

小さい電力で担体上の酸化還元電位を調節

事業原簿 III-2-5



高負荷時でも同様の微生物濃度を維持

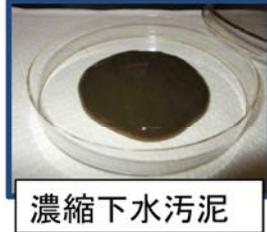
高負荷時でも同様の微生物種を維持

高負荷時において発酵槽内の微生物維持を確認

3. 成果の詳細

通電型固定床メタン発酵槽の評価(実廃棄物)

実廃棄物



SS濃度
(53.2 g/L)
COD濃度
(70.7 g/L)

濃縮下水汚泥

通電型固定床メタン発酵槽

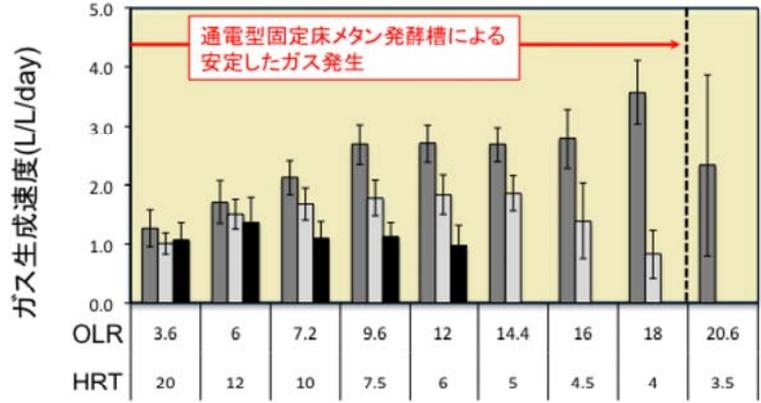
既設設備に対して
有機物負荷量:4.5倍
(水理的滞留時間:1/4に短縮)

発酵槽の設置面積:
36.3%にコンパクト化

50%にコンパクト化を達成

事業原簿 Ⅲ-2-5

■ 通電型固定床メタン発酵槽 □ 固定床型 ■ 完全攪拌混合型



| | 運転条件 | | | 処理性能 | | |
|------------|-----------|----------|-------------------|--------------|------------|-----------|
| | 発酵温度 (°C) | 滞留時間 (日) | 有機物負荷量 (gCOD/L/日) | ガス発生倍率 (L/L) | COD除去率 (%) | SS除去率 (%) |
| 通電型固定床 | 55 | 7.5 | 9.6 | 20.1 | 75.2 | 72.9 |
| 混合攪拌型 | 55 | 20 | 3.6 | 21.4 | 64.6 | 52.8 |
| 既設設備 (年平均) | 36 | 30 | 2.1 | 23.3 | 60 | 42.7 |

既設設備より約4.5倍の高負荷での処理

9/11

3. 成果の詳細

開発目標と達成状況

従来

目標

達成状況

【現状の能力】

(1) 生ごみ等を対象とした既設のメタン発酵処理施設

有機物負荷量
(日平均容積効率):
8.5 gCOD/L/日

(2) 下水汚泥提供元施設

有機物負荷量:
2.1 gCOD/L/日

【目標値】

生ごみ等を対象としたメタン発酵処理

既設の3倍の有機物負荷量での安定化
(25.5 gCOD/L/日)



従来の設備を50%にコンパクト化

【成果】

微生物群担体と通電による制御を組み合わせた通電型固定床メタン発酵槽(デザイン化)

・模擬生ごみを対象:
最大有機物負荷量89.3gCOD/L/日 ◎
(約21%にコンパクト化)

・下水汚泥を対象:
最大有機物負荷量9.6gCOD/L/日 ◎
(約36%にコンパクト化)

目標を達成

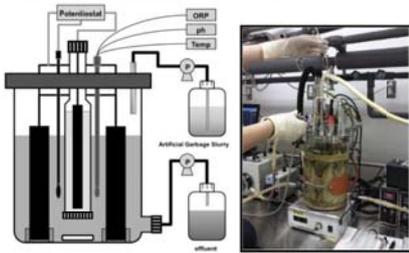
事業原簿 Ⅲ-2-5

10/11

実用化への見通し

微生物群集担体

担体への電気制御技術



通電型固定床メタン発酵槽

本プロジェクト

生ごみ等の廃棄物に対するメタン発酵処理の効率化の見通しを得た

本プロジェクト終了後5年

プラントメーカーとの共同開発

- ・段階的なスケールアップの検討
- ・コスト、エネルギー収支の評価

~10年

・実適用

波及効果

微生物群担体 電気制御技術

汎用的にバイオプロセスに適用できる微生物制御技術

波及先



廃水処理



食品



医薬品

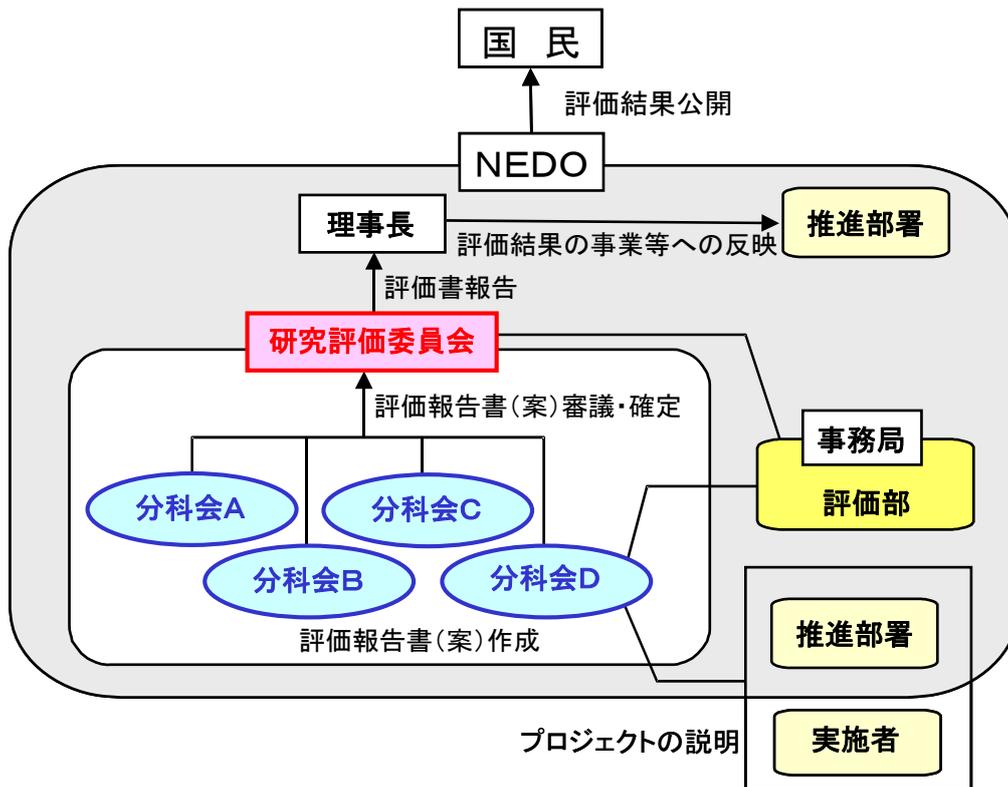
バイオプロセスに関わる分野

参考資料 1 評価の実施方法

本評価は、「技術評価実施規程」（平成 15 年 10 月制定）に基づいて研究評価を実施する。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）における研究評価の手順は、以下のように被評価プロジェクトごとに分科会を設置し、同分科会にて研究評価を行い、評価報告書（案）を策定の上、研究評価委員会において確定している。

- 「NEDO 技術委員・技術委員会等規程」に基づき研究評価委員会を設置
- 研究評価委員会はその下に分科会を設置



1. 評価の目的

評価の目的は「技術評価実施規程」において。

- 業務の高度化等の自己改革を促進する
- 社会に対する説明責任を履行するとともに、
経済・社会ニーズを取り込む
- 評価結果を資源配分に反映させ、資源の重点化及び業務の効率化を
促進する

としている。

本評価においては、この趣旨を踏まえ、本事業の意義、研究開発目標・計画の妥当性、計画を比較した達成度、成果の意義、成果の実用化の可能性等について検討・評価した。

2. 評価者

技術評価実施規程に基づき、事業の目的や態様に即した外部の専門家、有識者からなる委員会方式により評価を行う。分科会委員選定に当たっては以下の事項に配慮して行う。

- 科学技術全般に知見のある専門家、有識者
- 当該研究開発の分野の知見を有する専門家
- 研究開発マネジメントの専門家、経済学、環境問題、国際標準、その他社会的ニーズ関連の専門家、有識者
- 産業界の専門家、有識者
- ジャーナリスト

また、評価に対する中立性確保の観点から事業の推進側関係者を選任対象から除外し、また、事前評価の妥当性を判断するとの側面にかんがみ、事前評価に関与していない者を主体とする。

これらに基づき、分科会委員名簿にある6名を選任した。

なお、本分科会の事務局については、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構評価部が担当した。

3. 評価対象

平成19年度に開始された「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」プロジェクトを評価対象とした。

なお、分科会においては、当該事業の推進部署から提出された事業原簿、プ

プロジェクトの内容、成果に関する資料をもって評価した。

4. 評価方法

分科会においては、当該事業の推進部署及び研究実施者からのヒアリングと、それを踏まえた分科会委員による評価コメント作成、評点法による評価及び実施者側等との議論等により評価作業を進めた。

なお、評価の透明性確保の観点から、知的財産保護の上で支障が生じると認められる場合等を除き、原則として分科会は公開とし、研究実施者と意見を交換する形で審議を行うこととした。

5. 評価項目・評価基準

分科会においては、次に掲げる「評価項目・評価基準」で評価を行った。これは、研究評価委員会による『各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格、中間・事後評価の別等に応じて、各分科会において判断すべきものである。』との考え方に従い、第1回分科会において、事務局が、研究評価委員会により示された「 的評価項目・評価基準」（参考 % + 参照）をもとに改定案を提示し、承認されたものである。

プロジェクト全体に係わる評価においては、主に事業の目的、計画、運営、達成度、成果の意義や実用化への見通し等について評価した。各個別テーマに係る評価については、主にその目標に対する達成度等について評価した。

評価項目・評価基準

1. 事業の位置付け・必要性について

(1)NEDOの事業としての妥当性

- ・ 「環境安心イノベーションプログラム」、「エネルギーイノベーションプログラム」の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2)事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環

境が整備されているか。

- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5) 情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながるものが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3) 知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に

沿って国内外に適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

標準的評価項目・評価基準（事後評価）

2010. 3. 26

【事後評価 標準的評価項目・評価基準の位置付け（基本的考え方）】

標準的評価項目・評価基準は、第25回研究評価委員会（平成22年3月26日付）において以下のとおり定められている。（本文中の記載例による1・・・、2・・・、3・・・、4・・・が標準的評価項目、それぞれの項目中の(1)・・・、(2)・・・が標準的評価基準、それぞれの基準中の・・・が視点）

ただし、これらの標準的評価項目・評価基準は、研究開発プロジェクトの事後評価における標準的な評価の視点であり、各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格等に応じて、各分科会において判断すべきものである。

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 特定の施策（プログラム）、制度の下で実施する事業の場合、当該施策・制度の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法をを経由する場合、研究管理法が真に必要な役割を担っているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化、事業化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化、事業化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。

- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることを期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化、事業化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 産業技術としての見極め（適用可能性の明確化）ができているか。
- ・ 実用化に向けて課題が明確になっているか。課題解決の方針が明確になっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)事業化までのシナリオ

- ・ N E D O後継プロジェクト、N E D O実用化助成、企業内研究等、プロジェクト終了後の事業化までの道筋は明確か。
- ・ 市場の規模や成長性、コストダウン、競合技術との比較、導入普及、事業化までの期間、事業化とそれに伴う経済効果等の見通しは立っているか。

(3)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

※基礎的・基盤的研究及び知的基盤・標準整備等の研究開発の場合は、以下の項目・基準による。

*基礎的・基盤的研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることを期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

* 知的基盤・標準整備等の研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。

るか。

- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5) 情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は公開性が確保されているか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 研究内容に新規性がある場合、知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 整備した知的基盤についての利用は実際にあるか、その見通しが得られているか。
- ・ 公共財として知的基盤を供給、維持するための体制は整備されているか、その見込みはあるか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ J I S化、標準整備に向けた見通しが得られているか。注）国内標準に限る
- ・ 一般向け広報は積極的になされているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

参考資料 2 評価に係る被評価者意見

研究評価委員会（分科会）は、評価結果を確定するにあたり、あらかじめ当該実施者に対して評価結果を示し、その内容が、事実関係から正確性を欠くなどの意見がある場合に、補足説明、反論などの意見を求めた。研究評価委員会（分科会）では、意見があったものに対し、必要に応じて評価結果を修正の上、最終的な評価結果を確定した。

評価結果に対する被評価者意見は全て反映された。

参考資料 3 分科会議事録

研究評価委員会
「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」
(事後評価) 第1回分科会
議事録

日 時：平成24年4月19日(木) 12:50~18:00

場 所：大手町サンスカイルームA会議室(朝日生命大手町ビル27F)

出席者(敬称略、順不同)

<分科会委員>

| | | |
|--------|-------|--------------------------------|
| 分科会長 | 遠藤 銀朗 | 東北学院大学 工学部 環境建設工学科 教授 |
| 分科会長代理 | 古川 憲治 | 熊本大学 顧問(名誉教授) |
| 委員 | 原田 秀樹 | 東北大学 大学院工学研究科 教授 |
| 委員 | 三谷 優 | サッポロビール株式会社 価値創造フロンティア研究所 研究主幹 |
| 委員 | 村上 孝雄 | 地方共同法人 日本下水道事業団 理事 |
| 委員 | 安井 英斉 | 北九州市立大学 国際環境工学部 エネルギー循環化学科 教授 |

<推進者>

| | | | |
|---------|------|-----------------|-------|
| 森田 弘一 | NEDO | バイオテクノロジー・医療技術部 | 部長 |
| 三代川 洋一郎 | NEDO | バイオテクノロジー・医療技術部 | 主任研究員 |
| 長谷川 義基 | NEDO | バイオテクノロジー・医療技術部 | 主査 |
| 坂本 俊一 | NEDO | バイオテクノロジー・医療技術部 | 主査 |
| 石倉 峻 | NEDO | バイオテクノロジー・医療技術部 | 職員 |

<オブザーバー>

| | | |
|-------|---------------------|------|
| 野田 尚宏 | 経済産業省 製造産業局 生物化学産業課 | 課長補佐 |
|-------|---------------------|------|

<実施者>

| | | |
|-----------|------------------|---------|
| 藤田 正憲(PL) | 大阪大学 | 名誉教授 |
| 生田 創 | 株式会社日立プラントテクノロジー | 研究員 |
| 大橋 晶良 | 広島大学 | 教授 |
| 大村 直也 | 電力中央研究所環境科学研究所 | 上席研究員 |
| 松本 伯夫 | 電力中央研究所環境科学研究所 | 上席研究員 |
| 渡邊 淳 | 電力中央研究所環境科学研究所 | 主任研究員 |
| 森田 仁彦 | 電力中央研究所環境科学研究所 | 主任研究員 |
| 平野 伸一 | 電力中央研究所環境科学研究所 | 主任研究員 |
| 佐々木 建吾 | 東京大学 | 特任研究員 |
| 佐々木 大介 | 電力中央研究所環境科学研究所 | 特別契約研究員 |

森川 正章 北海道大学 教授
岡部 聡 北海道大学 教授
諏訪 裕一 中央大学 理工学部 生命科学科 教授
勝山 千恵 中央大学 理工学部 生命科学科 助教
後藤 正広 株式会社日立プラントテクノロジー 研究開発本部 松戸研究所
水環境システム部 主任研究員

<企画調整>

浅井 美佳 NEDO 総務企画部 職員

<事務局>

竹下 満 NEDO 評価部 部長
三上 強 NEDO 評価部 主幹
松下 智子 NEDO 評価部 職員
梶田 保之 NEDO 評価部 主査

一般傍聴者 2名

議事次第

<公開の部>

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
2. 分科会の公開について
3. 評価の実施方法と評価報告書の構成について

4. プロジェクトの概要説明
 - 4.1 「事業の位置付け・必要性」及び「研究開発マネジメント」
 - 4.2 「研究開発成果」及び「実用化の見通しについて」
 - 4.3 質疑
5. プロジェクトの詳細説明
 - 5.1 好気性処理
 - (1)日立プラントテクノロジー
 - (2)広島大学
 - (3)北海道大学（地球環境科学研究院）
 - 5.2 嫌気性処理
 - (1)北海道大学（工学研究院）
 - (2)電力中央研究所

6. 全体を通しての質疑
7. まとめ・講評
8. 今後の予定
9. 閉会

議事要旨

<公開の部>

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
 - ・開会宣言（事務局）
 - ・研究評価委員会分科会の設置について、資料1-1、1-2に基づき事務局より説明。
 - ・遠藤分科会長挨拶
 - ・出席者（委員、推進者、実施者、事務局）の紹介（事務局、推進者）
 - ・配布資料確認（事務局）
2. 分科会の公開について
事務局より資料 2-1～2-4 に基づき説明し、すべて公開とすることが了承された。
3. 評価の実施方法と評価報告書の構成について
評価の手順を事務局より資料 3-1～3-5 に基づき説明し、了承された。
評価報告書の構成を事務局より資料 4 に基づき説明し、事務局案どおり了承された。
4. プロジェクトの概要説明
 - 4.1 「事業の位置付け・必要性」及び「研究開発マネジメント」
推進者より資料6に基づき説明が行われた。
 - 4.2 「研究開発成果」及び「実用化の見通しについて」
実施者より資料6に基づき説明が行われた。
 - 4.3 質疑
4.1 及び 4.2 の発表に対し、質疑応答が行われた。

【遠藤分科会長】 ただいまのご説明に対して、これから質疑を行います。技術の詳細につきましては、この後、議題5で議論します。ここでは主に事業の位置づけや必要性、マネジメント、全体の概要、成果の概要でも結構ですが、大きなところを見ていただいてご意見をいただければと思います。

【三谷委員】 NEDO の長谷川さんにお尋ねします。資料に対象となるバイオマスの量が記載されています。今回、これが全部すぐに対応できるということではなく、NEDO は、こういう研究を行うことで、将来的にどういう目論見というか、どの程度の割合が処理の視野に入ってくるか想定していると思います。そのあたりをご紹介いただけませんか。

【NEDO：森田部長】 今のご質問について、ここは、基本的にはバイオマスの戦略ということ

で、日本全体のマクロな数字を掲げています。理想は、こうしたものを全部と言いたいところですが、恐らく、ここで確立した技術を順次使っていくということでしょうか、今の段階は申し上げられません。ただ、プロジェクトのアウトカムとして、こういうものを対象とすると想定しています。申し訳ありませんが、そのような感じでのご回答となります。

【遠藤分科会長】 今の質問に関連して、私から。市場規模は 1.5 兆円という説明がありました。私どもの手元にある資料では約 5,000 億円と書かれており、食い違いがあります。どちらが正しいのですか。

【NEDO：長谷川主査】 私のミスです。事前に評価書を先生方に送っていると思いますが、事業原簿に事前評価書が載っています。こちらの数字をとり間違えました。事業原簿の後ろから 2 枚目の(4)の「研究開発成果」の記載が正しい数字です。

【遠藤分科会長】 では、5,000 億円ではなく、1.5 兆円ということです。ほかにどうぞ。

【古川分科会長代理】 個々の開発テーマは、後ほどコメントしたいと思います。藤田先生が説明されたイメージ図について質問します。メタン発酵があり、硝酸化があり、アナモックスがある。そして、最後にリン回収が来ています。リンを吐き出させる時には有機物が要ります。その有機物はどうされるのですか。

【大阪大学：藤田教授(PL)】 一部は廃水の有機物を使います。詳細な点は、後ほどご質問いただければご説明できると思います。

【古川分科会長代理】 もう 1 点。中間評価の書類を読むと、有用微生物のところ、内生脱窒を、活性が低い菌を使って云々という話があります。それが今回は消えています。これについては何か説明がありますか。

【大阪大学：藤田教授(PL)】 その点につきましては、日立プラントテクノロジーの概要説明で少し触れました。当初、日立プラントテクノロジーは、目標として省エネを掲げていました。省エネですから、当然、酸素消費量をできるだけ減らしたい。内生脱窒は、結局、微生物そのものが、恐らく、BOD を酸化する時に使う酸素と自分の維持に使う酸素のバランスが、どうも内生のほうに行き過ぎているのではないかということ。ここには数値が出ていませんが、例えば内生呼吸で必要な酸素のうちの 30～40%は消費してしまう。それをできるだけ削減することが、トータルとして BOD 処理のための酸素量を減らす方法になるという発想で研究を始めました。実際には、平成 19、20、21 年度の前半の 3 年間で行いました。当初、いわゆる活性汚泥等からの分離も考えましたが、もう一つは、内生呼吸で作っていく代謝をうまく制御した微生物を遺伝子工学的に作っていき、それによる BOD の除去と内生呼吸の低減が研究成果として出てきました。そこまでは中間で出てきたので、ここでは、むしろ、次の平成 22、23 年度の成果を主として、アンモニアの亜硝酸化だけに絞って説明しました。

今回 5 年間全部のプロジェクトの成果をまとめることが一つの方法としてはある

と思いましたが、あまり前からまとめると膨らみすぎるため、このまとめ方にしました。内生呼吸が小さなものをいかに BOD 処理に使うかというユニークな発想ですが、同時に、本当にその様なことが可能かという発想でもありました。ある程度、呼吸系のどこかをたたくことで実際には可能であるという成果が中間で出ています。

【村上委員】 実用化のイメージ図について、はじめに嫌気性消化のメタン発酵があり、その後、一連のシステムが続きます。メタン発酵でも完全に有機物が分解されてしまうわけではなく、残りの汚泥が出ます。それはたぶん、上のほうに矢印が示してある「牧場・農地へ散布または他の廃水系へ」ということだと思います。まず、「他の廃水系へ」というのは、具体的にどの様なイメージですか。

【大阪大学：藤田教授(PL)】 これはあくまで想定図です。一つは、活性汚泥処理も処理系として考えています。農地散布は可能なところと不可能なところがあります。不可能な場合には廃水処理系に持っていかざるを得ないと考えて行いました。

ただ、「廃水系へ」と書いていますが、図を見ていただくとわかりますが、電中研と日立プラントテクノロジーの間に「炭素処理水」ということで「炭素」という言葉を書いています。カーボン系をどこかで処理しないと、次の窒素系と必ずしも同じにならないため、このようなイメージにしました。この辺が「他の廃水処理系」につながってくるということです。ここは先ほども言いましたように、様々な処理が既にある程度確立されていることから、単に炭素処理水という形で書きました。

【村上委員】 わかりました。これは感想です。廃水処理系で非常に斬新な新しい技術が並んでいます。しかし、汚泥の処理が昔ながらの牧場・農地散布です。この方法も一つの有力なリサイクル方法ですが、従来どおりという感じがしました。このプロジェクトの中では、ここは守備範囲でないかもしれませんが、このあたりも、得られた知見などでアイデアを少し盛り込むとよいという感想です。

【大阪大学：藤田教授(PL)】 ありがとうございます。この辺は、個々のプロジェクトとしては力を入れていたのですが、これは単に想定されるということで、さらりと流してしまいました。どうもありがとうございました。

【安井委員】 古川委員の質問にも関連しますが、この好気性微生物処理では、従来の標準活性汚泥法の曝気処理プロセスの3倍の高効率化、エネルギー使用量の3分の2の削減ということです。標準活性汚泥法の定義という問題はあると思いますが、曝気処理プロセスの3倍の高効率化、それによるエネルギーの3分の2の削減となると、ご説明いただいたアナモックスの部分硝化だけでは到底達しない数字です。この部分がよくつかみ損なったところだと思います。もしかすると、当初の研究目標に、内生呼吸量を下げることによって必要なエアレーションを下げようという、かなりチャレンジングなものがあったと思います。それが途中で方針転換されたということは、この目標はまた別のものとして新しく設定したという理解でよろしいですか。

【大阪大学：藤田教授(PL)】 いくら酸素量を削減するか、省エネ効果を上げるかに関して、

基準をどうするかは、内部でも微妙に迷いました。硝化を亜硝酸化で終わるということは、少なくとも亜硝酸から硝酸に行く間の酸素量は必要ないであろうということ、それから、アナモックス反応を考えれば、さらに2分の1は酸化する必要はない、そういうことも含めてここでは考えたということです。

【安井委員】 標準活性汚泥法における窒素処理の効率化ということならばわかりますが、この最終目標は、あくまでも標準活性汚泥法での曝気処理プロセスに対してです。その部分は、この目標の達成の評価をどのように考えるか、悩むところです。

もう一つは、嫌気の部分で、従来のメタン発酵法では対応が困難であった性状・組成の有機廃物への処理への適用拡大とあります。これは、どのようなものですか。

【大阪大学：藤田教授(PL)】 必ずしも明確に、こういうものというイメージはありません。一つは、通電により、ある種の電氣的な環境が変わること、もう一つは付着をうまく使うことができるだろうということで、かなり高速になると考えています。

もう1点は、高アンモニア濃度の廃水なども適用できるのではないかと、いうところまでつかみ始めています。特にメタン発酵の場合、アンモニア阻害が起こる可能性が非常に高い。そこも、チャンスとしてはあるかもしれません。我々の単純なイメージとしては、ここは単に、いわゆる廃棄物系の有機バイオマス系のようなものだけを考えていました。しかし、その混合物などもあり得ると思います。村上委員はよくご存じですが、下水汚泥単独ではなく廃棄物が入る、あるいは、し尿と下水汚泥を一緒に行う、そういうことも含めて広がっていくと思います。技術からの発展というより、そういうものに対しても適用可能であろうと書いた、あるいは、筆を滑らせたと言うべきかもしれませんが、書かせていただきました。

【原田委員】 私も安井委員と同じことを考えていました。このプロジェクトの最終目標が、活性汚泥に比べてエネルギーの消費量を3分の2削減するということは、3分の1にすることになります。その目標達成度が、成果として書かれていません。ここはぜひそういう基軸を入れる必要があると思います。

個々の開発技術の質問は後で行いますが、開発した技術を全部インテグレートして、一気通貫のシステムがこういう形で想定できるというイメージが描かれていて、非常によいのですが、やはり最終目標が書かれていて、それに対してどこまで満足できたのか、あらわしてほしいと思います。

【安井委員】 私自身も NEDO のプロジェクトを、過去に実施側から携わったことがあります。これは評価部の方をお願いしたいのですが、最初に最終目標を立てる。その最終目標は極めてチャレンジングです。しかし、実施する過程で、これはやはりとても難しかった、だから方針転換を行う。例えば硝化脱窒のように、より早く実用化でき、かつ、ブレークスルーとなるものに資源を集中した。今回はそういう経緯がありましたので、この部分について、例えば標準活性汚泥法の3倍を最終目標にしたが、この部分は目標未達というネガティブな評価ではなく、中間評価を踏まえて、

合理的な判断によって、窒素除去という、世界でも相当ニーズが高い分野に資源を集中したと考えるほうがよいと思います。

そうしないと、最終目標を立てて、それを見かけで満たさないものは全部ネガティブな評価にせざるを得ません。それはもったいないし、非合理的な評価になります。この部分は、技術を育てるという発想で進めていくことができればと思います。

【NEDO：竹下部長】 評価部ということでしたので、お答えします。評価は、委員の総意としてどう考えるか。このプロジェクトの目標が非常にチャレンジであった、達成したことには大変意義があり、将来的に実用化の可能性もあるということであれば、そのようにまとめてもらえばよいと思います。

そこは評価部が判断するよりも、評価委員の総意としてどう判断するかということだと思います。

【遠藤分科会長】 ありがとうございます。先ほどの原田委員のご質問と、安井委員からあったご質問は、ある意味で反するところがあります。この目標に対してどうであったかを書くことはやはり必要かもしれません。ただし、それが、途中の経過を説明することによって理解できるのであれば、それでよいのではないかと思います。

【安井委員】 原田委員と反しているわけではなく、遠藤分科会長が言われたことと同じです。目標を達成したもの、達成できなかったものというのは、理由を明確に評価書なり、報告書に記述するのがNEDOプロジェクトでは一番大事だと思います。

資料では「高効率型廃水・廃棄物等処理の基盤技術を確立する」と明記されています。この基盤技術は一体どういうものであったのか、成果としてこの基盤技術は具体的に何々であったかは、ぜひリストアップしてほしいと思います。

【遠藤分科会長】 よろしいですか。メタン発酵についても目標を書いています。それも同じように扱ってほしいと思います。

【大阪大学：藤田教授(PL)】 先ほど来、委員の方から、温かいコメントをいただきました。報告書を大きく手直しするというのではなく、NEDOでもコメントがあるということです。目標に対して、我々も一度中間時点で評価を受け、最終年度へ向けて、これは2年間ですが、少し目標を修正しました。これは当然、内部で調整しておくべき問題でした。

【NEDO：長谷川主査】 私の大きなミスですが、当初の基本計画をここに載せたままでした。しかし、平成21年度の終わりの中間評価を受けて、基本計画を見直しています。事業原簿の後ろから6枚目、「基本計画」の2ページに最終目標を書いています。「(2) 研究開発の目標」とあります。上から8行目、「従来の標準活性汚泥法の処理プロセス」と書いてあります。「曝気」を抜いて、基本計画をNEDOでも上のほうまで上げています。曝気プロセスだけではなくて処理プロセスとして、すべての処理プロセスでエネルギーの低減を見ていただくこうとして、こうしたことを行っています。スライドが間違っており、「曝気処理」の「曝気」を削除しなければならないところ

が残っているため、おかしいということです。

【村上委員】 電中研の研究についての説明ですが、「世界の技術レベル・開発動向」の欄の③に微生物燃料電池が載っています。その右側の「本プロジェクトの優位性」の欄にも①から③まであり、右側の欄の③は、左側の微生物燃料電池に対応したということですか。これは、別の話という理解でよろしいですか。

【電中研：松本上席研究員】 この微生物燃料電池の研究は、あくまでも「世界の技術レベル・開発動向」ということで書いています。要するに、電位制御でのリアクタというものがないので、比較的類似した技術体系として、開発動向では燃料電池を書いています。本プロジェクトで燃料電池の研究を行ったということではありません。

【遠藤分科会長】 この微生物群のデザイン化は、こういう理解でよいかという確認です。要するに、廃水・廃棄物処理微生物生態系の人工的構成であって、その人工的制御であると理解してよいですか。

【大阪大学：藤田教授(PL)】 我々の内部では、今、委員長が言われた理解で進めています。その中には、手法の問題や様々なものが含まれていますので、それらを含めてすべて実験したというわけではありません。もっとほかに様々な手法があると思いますが、このグループ内では、通電などの手法で制御しようと考えました。

【遠藤分科会長】 わかりました。ありがとうございます。それでは、議題4はほぼ予定の時間ですので、この辺で質疑を打ち切ります。

5. プロジェクトの詳細説明

5.1 好気性処理

(1) 日立プラントテクノロジー

実施者より資料7-1-1に基づき説明が行われた後、以下の質疑応答が行われた。

【古川分科会長代理】 部分亜硝酸化についてお聞きします。実証試験ということで、大規模なプラントで、安定的にアナモックスに適した部分亜硝酸化を達成していることは非常に評価できます。嫌気性硝化脱窒液のように窒素濃度が高い場合、私たちの実験などでも、こういう pH 処理をしなくても、フリーのアンモニアの阻害を利用して、温度をあまり上げなくても部分亜硝酸化が起こります。pH ショックを与えることによって、それ以上の大きなメリットがありますか。

【日立PT：生田研究員】 質問ありがとうございます。pH ショック、加熱ショック等々を行わなくても、遊離アンモニアが十分に存在していれば、亜硝酸型硝化は達成できます。つまり、硝酸の生成を抑制できます。今回わかったことですが、亜硝酸型硝化になるとどうしても、アンモニアからの N_2O 発生量が非常に高くなります。我々の転換率という評価方法では、8%程度に達します。非常に高いというデメリットがわかってきました。この方法では、今、 N_2O の規制はありませんが、地球温暖化

等を考慮すると、これも削減できたほうがよいと考えました。pH ショックを行うと、これを2%未満に抑えることがわかっています。この方法は、その点からは有効と考えています。

【古川分科会長代理】 代謝経路はどうなるのですか。

【日立PT：生田研究員】 これは非常に興味深いところですが、今回は現象論しかわかりませんでした。今言われているヒドロキシルアミンからなのか、NO₂からの反応なのか、もしくは、脱窒菌が働いているのか、別の菌が働いているのか、亜硝酸酸化細菌が働いているのか、これはわかりません。今後の課題になります。

【古川分科会長代理】 それが明らかになると面白いと思います。この方法をもっと濃度が低い100以下で安定的に行おうとすると、フリーのアンモニアの阻害だけでは難しい。pHショックで安定的に行うことができるのであれば、非常に評価できる方法です。

【日立PT：生田研究員】 ありがとうございます。

【村上委員】 もし、データをお持ちならば教えてほしいのですが、pH ショックの代わりにヒートショックを与えても同じようにN₂Oへの転換率が減る現象が起きますか。

【日立PT：生田研究員】 加熱処理はまだ確認できていませんが、恐らく、同じような現象が起こるであろうと予測しています。

【安井委員】 また亜硝酸型硝化の話になりますが、今回の研究を担当しているのはメーカーです。ほかの会社の研究開発との競争になります。今回の研究の成果の目玉として、pH ショックによって、より低濃度のアンモニアまで亜硝酸型硝化ができたと理解しています。既往の研究では、どの程度濃度の低いアンモニアまで適用でき、それはどの方法を使う、そういう情報の整理はありますか。それをもとに、この技術に対しては勝てる、ここでは競合する、そういうものが必要と思いますが。

【日立PT：生田研究員】 ありがとうございます。他社動向ですが、どこまでできるのか、論文ベースでの報告をいろいろ見えています。その報告の中から、それが実機ベースでデータが適用できるかどうかは我々ではわかりませんので、実際にどの辺が下限値かは、明確な値は確認できていません。ただし、遊離アンモニア濃度から見ると、恐らく、遊離アンモニア態窒素から見ると、1～2 mg/Lであろうと言われてます。ただ、これも微生物の菌量によって変わると言われています。そこから勘案して、対象とするアンモニア濃度の限界値は200～400程度と考えています。

【安井委員】 NEDOのこの研究が始まった2007年の少し前くらいから、亜硝酸型硝化アナモックスという研究が進み、この時点でも幾つか実際の装置が立ち上がっています。それに対して、もう少し性能を上げよう、あるいは、低濃度なアンモニアの廃水まで適用対象を広げようというアプローチですね。

【日立PT：生田研究員】 はい。

【安井委員】 最後に、担体添加型バーデンフォ法と比べて、この様に安い、下がっているとしても、実際にそういう適用対象の部分で担体添加型バーデンフォ法を使っている

ものがどれくらいあるのか、いささか疑問です。比べる対象はもっと別のものになると思いました。これはコメントです。

【日立PT：生田研究員】 ありがとうございます。

【原田委員】 内生呼吸の部分の酸素消費を少なくすることがもともとの研究の狙いでした。曝気した酸素のうち生物に利用される酸素は何%程度ですか。

【日立PT：生田研究員】 曝気してDOに消費される部分と、抜けていく部分と、この2つに対して酸素が実際に微生物に利用される、その消費速度にいく割合ですね。

【原田委員】 はい。

【日立PT：生田研究員】 対象の水のBOD/N比により変わります。申し訳ありませんが、今数字が出てきません。もちろん、すべてではありません。そのうちの何割かです。

【原田委員】 何割程度ですか。

【日立PT：生田研究員】 すみません。例としてこの水であればということでお答えできればよいのですが。

【原田委員】 村上委員にお聞きしたほうが早いですか。

【村上委員】 溶解効率は10%ぐらいです。

【原田委員】 その系を改善する、リアクタの物理的な改善は技術の開発余地がないと。それで、内生呼吸の低減菌を探そうということですね。10%しか使われていないのであれば、酸素を入れる効率を上げるほうが、伸び代が大きいのではないかと。そういうことが技術開発の一つのポイントだと思います。

それから、内生呼吸と外生呼吸の比が、大きく分けて3つのグループに分かれます。20以上のところ、10前後、ワンオーダー下しかないものと。これは、それぞれのグループで、何か遺伝子的な特徴や生理学的な特徴などがありますか。

【日立PT：生田研究員】 ディフューザーを開発すればまだ余地があるのではないかと。最初のご質問について、我々も、可能性がゼロとは考えていません。やり方はまだあると思います。ただ、投入するエネルギーもそれだけ増えます。そこも加味しながら検討する必要があります。手法はいくつもあって構わないと思います。微生物のところを下げるという検討があまりにもないと考え、今回、このような研究を行いました。

この3つにグループに分けたことについて、遺伝的なデータとして特徴的なものは、この中からは見えていません。

【三谷委員】 pHショックについてお尋ねします。亜硝酸酸化菌が、pH13あるいはもう少し低いpHでも処理できることについて、これはたまたまですか。あらかじめ意図してpHショックを行うことで除くことができるという目論見があったのですか。

【日立PT：生田研究員】 内生呼吸低減菌のお話ですか。

【三谷委員】 違います。アルカリショックです。ゲルを亜硝酸型にする場合であったと思います。

【日立PT：生田研究員】 低いアンモニア濃度でも、pH ショックで、不要な亜硝酸酸化細菌が消えるという期待は、遊離アンモニアに頼らなくてもできるという予測がありました。流入水中にも亜硝酸酸化細菌はいますが、定期的に引き抜き pH ショックという形で担体を処理しているため、入ってきても、殺すことができるという考えもありました。ただし、対象アンモニア濃度がさらに薄くなった時のことは、まだ確認できていません。

【三谷委員】 デザイン化という最初の定義で始めた研究であるため、仮説があり、それを実証する段取りだと思います。その辺りの移動をわかりやすくお話いただければ、このとおりにデザイン化できたことがわかるという意味でお尋ねしています。

【日立PT：生田研究員】 わかりました。デザイン化の中で、この2種類のバクテリアに着目した時の、そうした現象が起こるであろうことは、今回の研究を行う前から大体予想していました。外部から入ってきた菌が付着して、それが増えていくことがどの程度寄与するか、わかりませんでした。実廃水を用いて処理することが、重要でした。今回、それを達成できることが確認できました。

【三谷委員】 ありがとうございます。実用化でお話があると思いますが、現実にアルカリ処理を採用するとして、かなり大きなスケールの設備をアルカリ処理しなければいけません。担体だけ取り出して行えばよいということもあると思いますが、何かイメージがありますか。

【日立PT：生田研究員】 はい。反応槽に充填している担体の約2%です。2%という小さく聞こえますが、処理槽の規模が大きくなると2%でも膨大な量になります。それを縮小していくことも今後は検討しなければと考えています。やり方としては、担体を引き抜いた時に一緒についてくる随伴水がありますので、その水をはじく、あとは、担体を引き抜く頻度をあげて、引き抜く量をさげる方法があります。これは確率統計的なシミュレーションになりますが、そちらを検討して、もっと低い量で、より頻繁に処理する等の検討は必要と考えています。しかし、今、最も効率がよいものが2%であると我々は計算しており、現在はこの方向で進めていこうと考えています。

【遠藤分科会長】 私から一つだけ、技術的な点で質問します。微生物の種の比率の円グラフについて。要するに、クローニング解析の結果をパーセントで示していると理解してよいですか。

【日立PT：生田研究員】 そうです。

【遠藤分科会長】 長い時間が経過すると、ほとんどアンカルチャードになってくるということのようです。通常ではない微生物がそこに増えてくると理解してよいですか。

【日立PT：生田研究員】 いえ、アンカルチャードのバクテリアはまだまだ多く存在します。特殊な菌がいるというよりも、カルチャーされている菌が少ないと理解しています。

【遠藤分科会長】 ただ、ニトロソモナスなど、従来よく知られていない細菌が多くなってき

ていることは間違いないと理解してよいですか。

【日立PT：生田研究員】 ここではむしろ、ニトロソモナスユーロピアが全体に対して非常に少ない量しか存在していません。今回クローニングしたものが 96 穴プレート・1プレートです。96 クローンを見ました。その中に入っていない、つまり、1%よりも低い量しか存在していないことでも、これだけ硝化反応が活性化していることがわかったことと、ほかの菌が大量に存在していて、pH ショックによって、わからない菌が増えることがあるのか、結論が出せません。微生物でカルチャブルな研究が全体の何%かということを見ると、わずか数%と言われていしますので、その中でこのアンカルチャードが特殊な菌なのか、今のところ、私では判断できません。

【遠藤分科会長】 ありがとうございます。それでは、ほかにもあるかもしれませんが、おおよそ予定の時間が参りましたので、何か特にとということがなければ次に移ります。

(2)広島大学

実施者より資料7-1-2に基づき説明が行われた後、以下の質疑応答が行われた。

【村上委員】 リンの回収で教えて下さい。P-DHS リアクタの回りの、長期のリンの収支がどうなっているのか、イメージが湧きません。活性汚泥を使う場合と違い、スポンジの中に含まれているリンの量はコンスタントで、特に増加などはしないという理解でよいですか。

【広島大学：大橋教授】 これを1年間運転したのですが、その1年間、汚泥は全く引き抜いていません。入ってくるリン濃度も低くて、2mg/L以下、1.5程度のリン濃度です。リン濃度は、まだ除去率が悪いですが、1程度になっています。

除去されたものは濃縮液に行きます。濃縮された液は 60mg/L になっていて、収支的には合致しています。除去されたものは濃縮液槽に行きます。汚泥にもたくさん付いていますが、汚泥に行くよりも回収のほうに回っているという状況です。

【三谷委員】 ベーシックな質問です。ポリリン酸として体内に一時的に蓄積して、それを吐き出させるという検証は理解できました。微生物的に、ポリリン酸の状態に出ているのですか。かなり、高分子ですね。

【広島大学：大橋教授】 嫌気状態でポリリン酸からリン酸を体外に出します。それを普通の PO_4 で……。

【三谷委員】 では、ポリではないですね。

【広島大学：大橋教授】 ポリではありません。体内ではポリになっていますが、出されたものは普通のリン酸塩になっています。このままでは使えないので、MAP など様々な方法で回収する必要があります。高濃度になっていますので、そういう技術を組み合わせれば可能になります。

【原田委員】 ポリウレタンのスポンジの微生物保持性を利用して新たなアプリケーションの

場として、溶存メタン、亜酸化窒素の酸化、リンの回収と、多様で膨大な実験を行い、すばらしい成果が出ていることに、まず敬意を表します。

一つ伺いたいのは、溶存メタンの酸化について、実廃水に近いものを使って研究すると、アンモニアも、メタンも、硫黄も酸化できる。有機物もそうです。その反応の優位性が、まず有機物が酸化され、硫黄が酸化され、メタンが酸化される。その次にアンモニアが酸化されるという順位があるというお話でした。これは、酸素を電子アクセプタとして、電子ドナーがそれぞれ有機物であり、硫黄であり、アンモニアであり、メタンですね。

【広島大学：大橋教授】 はい。

【原田委員】 それぞれの電子ドナーと、酸素が電子ドナーの時、電子1個当たりの G の順位もその順番になっていますか。

【広島大学：大橋教授】 メタンとアンモニアについては忘れましたが、たぶん、なっています。熱力学的に、亜硝酸化が一番 G が小さいです。

【原田委員】 亜酸化窒素の酸化とメタンもカップリングできる、うまく利用して両方とも除去できるのですね。その時の G は、電子1個当たりどの程度ですか。

【広島大学：大橋教授】 大変高いです。数値は書いていませんが、酸化だけですと 21 ですが、これの 10 倍以上です。

【原田委員】 この一番下の式ですね。この電子1個当たり 10 倍以上ですか。

【広島大学：大橋教授】 これは非常に高いです。本当に高いです。有機物酸化以上です。

【原田委員】 これは一つの菌が働くのですね。

【広島大学：大橋教授】 まだ明確なことは言えません。

【原田委員】 これは非常に面白いですね。

【広島大学：大橋教授】 これは誰も報告していないので、我々も半信半疑でした。

【原田委員】 これが見つければ、アナモックスと同じくらいのインパクトがあります。

【広島大学：大橋教授】 ただ、まだ反応が起きることを我々はコントロールできていません。現象はわかりましたが、コントロールできていません。これも 2 年で終わってしまったので、我々の研究としては続けていますが、このプロジェクト自体は、ここでストップしています。

【原田委員】 広島大学の研究全体として、さきほどプロジェクトリーダーから、リンの回収部分の研究に対しては特許が取得できたという報告がありました。この溶存メタンの酸化の部分は、特許を取得していますか。

【広島大学：大橋教授】 取得していません。わかりませんが、公知の事実ですが、酸化するということがあるので。

【原田委員】 でも、こういうプロセスで取れるというのは、特に、下水のような低濃度の有機物性の廃水でメタン発酵を利用して下水処理を行うことは、途上国では世界的な潮流になりつつあるため、この技術は必ず必要になってきます。膨大な量の下水を

嫌気性で処理すれば、必ずメタンが大気中に放散されます。この技術をかませることで意義が大きくなります。リン回収の部分は国内の特許だけです。広島大学だけではなく NEDO にもお願いします。ぜひ国際特許取得に向けて尽力して下さい。

【広島大学：大橋教授】 ありがとうございます。

【古川分科会長代理】 下水処理場に置かれたフローのスライドを見せて下さい。あまり時間がなく詳細な説明が行われませんでした。UASB-DHS は、上部に DHS を置いて、下部が UASB になっているのですか。

【広島大学：大橋教授】 私の書き方が間違っており、UASB が最初です。嫌気性処理でメタンを取ろうと。その後段処理で、先ほど言った溶存メタンを取って。

【古川分科会長代理】 次の写真では UASB 槽と DHS と別個ですね。

【広島大学：大橋教授】 これは、生下水が入ります。沈殿池に行った後で UASB に入ります。UASB はアップローですので、一旦、パイプで下まで落とし、そこからアップローで上がります。アップローで上げているのでポンプが必要です。その後は自然に流下させる、ポンプを使わないでそのまま自然落下させるだけです。エネルギーとしては、最初にここにポンプがありますが、ポンプアップするだけで処理ができます。

【古川分科会長代理】 そのスポンジは、吊るすのではなく積んでいるだけですか。

【広島大学：大橋教授】 実験室用では、簡単であることと、体積が少なくて済むので吊るしてありますが、実際の処理では、ランダムパッキングのほうが楽なので、スポンジをランダムに入れてあります。

【古川分科会長代理】 リンの回収用には、中が働いていないので外側だけでよいだろうということで、目詰まり防止も兼ねているのですね。

【広島大学：大橋教授】 はい。P-DHS 用担体を使っています。

【古川分科会長代理】 有機物を入れて吐かせる段階の時には、水を満たしてそのままですか。

【広島大学：大橋教授】 はい。3時間放置するだけです。

【古川分科会長代理】 3時間漬けて出すだけということで、攪拌は行っていないのですか。

【広島大学：大橋教授】 はい、行っていません。

【古川分科会長代理】 その時に、3時間後に水を抜いた時に、SS や剥離などはあまり起こらないですか。

【広島大学：大橋教授】 ご説明できませんでしたが、この東広島の下水は特別で、硫酸塩が通常の下水の 10 倍、400mg/L ありますので、真っ黒になりました。普通は、黒くなる程度で、実験室ではきれいな処理液ができます。真っ黒になった理由は、おそらく硫酸還元菌が繁殖したからです。どこで繁殖するかというと、有機物が少し残っているため、P-DHS でリンを回収していますが、これを貯めます。これは濃縮された液ですが、有機物が残っているので、硫酸還元菌が入って、硫化水素を出しています。硫化水素が出ていることは確かめています。それでポリリン酸菌に悪さをしていることから、硫酸塩濃度が高い場合には適用できないと思いました。しか

し、好気状態にすると硫酸還元菌が抑えられ、硫酸塩濃度が高くても適用できることの説明をしたかったのです。こうなると、SSはあまり出ません。

【遠藤分科会長】 先ほどの原田委員のご質問に関連して、メタン酸化と亜酸化窒素の還元がカップリングしているとする、メタン酸化系の酵素と $\text{N}_2\text{O-R}$ が両方あるのか、それぞれを持つ菌が一緒にいるのか、そういう遺伝子や酵素レベルでの解析は行っていないのですか。

【広島大学：大橋教授】 行わなければと思いついていません。炭素と窒素でラベリングして確認しなければと思っていますが、まだそこまで行き着いていません。現象論しかないということと、どの様な微生物がいるかということで、今後は少し研究しなければならぬと考えています。

【遠藤分科会長】 今後行うということですね。ありがとうございます。ほかにどうしても聞いておきたいことがありますか。ないようですね。では、次に進みます。

(3)北海道大学（地球環境研究院）

実施者より資料7-1-3に基づき説明が行われた後、以下の質疑応答が行われた。

【三谷委員】 先ほどの説明で、未知なる共生細菌を単離したということでした。その活性成分は未同定かもしれませんが、見つかりつつあるというお話であったと思います。その前段で、インタクトといいますか、サスペンションした系と、フィルム化したところでは差があるということでした。菌体量ではなくてタンパク量当たりで換算していますが、1個当たりの菌の活性が上がっていると思います。それは共生している微生物であるという理解でよいですか。

【北海道大学：森川教授】 こちらの実験は、単独でアンモニア酸化細菌だけをバイオフィルム化させた時と、浮遊細胞の状態を比較した結果です。未知なる共生細菌と共存している時の遺伝子の発現解析はまだできていません。今わかっているのは、レインヘイメラ属、共生する新しい微生物が低分子の分泌性の物質をアンモニア酸化細菌に供給しており、それが新規の物質であろうということです。こちらの遺伝子の発現量は、まだ確認できていません。

【三谷委員】 わかりました。すると、フィルムの場合は共生系ですが、サスペンションな状態でも同じ微生物を共存させた場合は、同じ処理活性が出るのですね、きっと。

【北海道大学：森川教授】 はい。添加効果は認められます。バイオフィルムになっていない場合でも、浮遊状態のアンモニア酸化細菌に対しても、共存させることで活性が上がることを確認しています。

【原田委員】 その共生細菌は何をしているのですか。

【北海道大学：森川教授】 この物質が何か、まだわからないため、それ以上はわかりません。

【安井委員】 確認ですが、共生細菌と言うからには、このMR3も、AOBと存在することに

よって何かメリットを得て増殖しているという意味ですか。

【北海道大学：森川教授】 それについては「共生」は適切な表現ではなかったかもしれません。「共存細菌」というレベルです。

【古川分科会長代理】 アナモックスのバイオフィルムについて、新しい知見で非常に面白いと思います。私の理解では、アナモックス菌と共生するフロック形成菌であるようなグラニュールを形成していると思います。先生の研究結果では、アナモックス細菌が持つヒドラジン・ハイドロレースがバイオフィルムの生成に関与しているということですか。

【北海道大学：森川教授】 まだ間接的な証明ですが、少なくとも、このヒドラジン・ハイドロレースの遺伝子群を大腸菌に発現させると、大腸菌同士が付着したり、固体表面でのバイオフィルム形成が上がります。類推ですが、これらのタンパク質群も細胞の付着に何らかの影響を及ぼしているということです。古川先生がご指摘のとおり、グラニュールを SEM などで見ますと、糸状性の菌をたくさんとりまとめているので、必ずしもこれだけでグラニュール化しているとは考えていません。

【古川分科会長代理】 非常に面白い結果です。HH がグラニュールに関係しているのは、純粋分離できていないので証明は難しいと思いますが、非常に新しい知見です。研究を進めてほしいと思います。

【北海道大学：森川教授】 ありがとうございます。証拠としては弱いのですが、少し光が見えてきたというところです。

【古川分科会長代理】 それと、硝化菌の場合でもグラニュールを作るのですね。その場合に、先生が見つけられた共生菌、レインヘイメラという菌は今までに報告されていないのですか。

【北海道大学：森川教授】 活性汚泥からの報告も一部はありますが、主要なものは海洋性細菌としての報告例です。海洋性細菌なので、比較的塩分に対しても強い特性が知られています。

【古川分科会長代理】 海洋性細菌で、これも非常に面白いですね。

【北海道大学：森川教授】 はい。これもまだスピーシーズの段階で、新種の可能性があるため、もう少し研究を続けたいと思っています。

【遠藤分科会長】 ほかにありますか。では、私から2点質問します。アナモックス細菌のグラニュールの形成の全体的なメカニズムはわかっているのですか。

【北海道大学：森川教授】 不勉強かもしれませんが、わかっていないと理解しています。

【遠藤分科会長】 グラニュールを形成するという事実はあるが、どうして形成するのか、どういう過程を経て形成されてくるのか、それらはまだわかっていないのですね。

【北海道大学：森川教授】 はい。

【遠藤分科会長】 もう一つは、浮草の根圏細菌の話です。これを実際に水処理や廃棄物処理に適用するとすると、どういう形をとるのか。実際の最終的な利用形態というか、

その辺を教えてください。

【北海道大学：森川教授】 あくまでも試算ですが、従来の嫌気・好気の二槽式の水処理の後段のところを、50%の負荷を残したまま後半に植生浄化を、浮草を浮かべた系で処理した場合を試算しました。曝気のコストがいらない、光のエネルギーを使うことによってエネルギーの消費量が、もともと $810\text{Wh}/\text{m}^3$ であったものが、 $315\text{Wh}/\text{m}^3$ ぐらいまで低減できます。あくまで試算ですが、ここからバイオマスを作ることができるため、そこからエタノール等のエネルギーを生産するということで $60\text{Wh}/\text{m}^3$ 程度は回収できます。かなり効果が期待できるという試算をしています。

【遠藤分科会長】 浮草の増殖も一方では考えているのですね。

【北海道大学：森川教授】 はい。バイオマス生産も考えています。

【遠藤分科会長】 要するに、水を処理した後のポリシング、あるいは、難分解性でさらに残ってしまう物質の高度な浄化としての利用を考えているのですね。

【北海道大学：森川教授】 はい、そうです。いわゆる高度処理の場合は、オゾン酸化等が使われます。それに代わる根圏から様々なライブラリを作っていますが、難分解性の、POPs まではまだ行っていません。ただ、ビスフェノールAやエストロゲンなど、環境ホルモンを分解するような菌も根っこから採れています。そうしたものをうまくデザイン化というか、集積させることで、これまで高価でコストがかかっていたものを、より安価なシステムにできると考えています。

【古川分科会長代理】 先生の研究は、学問的には新規性があるって非常に面白いと思います。しかし、目的として、例えばこのバイオフィルムの工学的な手法を適用して、アナモックスプロセスをより安定なものにする、そのことについて先生は80%と書かれています。これが実用化に少しでも適用できればおもしろいと思います。

【北海道大学：森川教授】 ご指摘のとおりです。まだ、メカニズムを明らかにする段階で、実際にどう使うことができるか、方針というか、アイデアがありません。

【古川分科会長代理】 今、アナモックスを活性汚泥から集積すると1年ほどかかります。その時の知見を利用してバイオフィルムを作る、そういう遺伝子を導入する、何かヘルパーのようなものを入れると、1カ月でアナモックス菌ができるようになると、大変大きな影響があります。ぜひともそういうところを目指して下さい。

【北海道大学：森川教授】 ありがとうございます。

【遠藤分科会長】 今後、研究を続けるということですね。ほかにございますか。それでは、ここで質疑を一旦打ち切ります。

5.2 嫌気性処理

(1)北海道大学（工学研究院）

実施者より資料7-2-1に基づき説明が行われた後、以下の質疑応答が行われた。

- 【古川分科会長代理】 これは提案ですが、アナモックスをすべて大文字で表記したり、最初のAだけ大文字で表記しています。記述が様々なので統一してほしいと思います。統一する際に、意匠登録されているものがあるので、注意するとよいと思います。
- 【北海道大学：岡部教授】 ありがとうございます。気をつけます。
- 【古川分科会長代理】 代謝経路を明らかにした非常に面白い結果だと思います。それと、部分亜硝酸化をするのに、グラニュールを作るという目的で酢酸を入れています。グラニュールができた後で酢酸を抜くとグラニュールが壊れませんか。
- 【北海道大学：岡部教授】 いえ、もっと強固なグラニュールができます。グラニュールの大きさは、直径が1 mm程度の小さなものになりますが、より強固になります。
- 【古川分科会長代理】 グラニュールを使ってアナモックスで途中から入れるところを工夫して行くと、高い負荷がとれるということでした。これは非常によいと思います。配付資料では、グラニュールだけで30何キロという高い負荷になる。大量の窒素が出て、相当量のGSSをつけないといけないと思います。GSSのことは何も書いていませんが、固液分離はどうしていますか。
- 【北海道大学：岡部教授】 全く何もしなくてよい状態です。
- 【古川分科会長代理】 ガスがもの大量に出るはずですが、30何キロであれば、ガスで激しく攪拌されると思いますが。
- 【北海道大学：岡部教授】 このような形のリアクタになっています。斜めにしているのはなぜかとよく質問されます。ガスが若干たまりますが、排水とともにガスが常に流れていくので、ガス抜きは全く設けていません。
- 【古川分科会長代理】 グラニュールが処理水に出ていきませんか。
- 【北海道大学：岡部教授】 説明を忘れましたが、ここにメッシュをはめてあります。それでブロックしています。先ほど、実廃水を投入した時に詰まったと説明しました。ここが詰まりました。そのような欠点はあります。
- 【古川分科会長代理】 確かに、30何キロというのはすごい速度です。我々の実験でも、10キロ程度になるとグラニュールだけで大変です。GSSを付けないと、縦型では無理ですが、斜めにした利点かもしれません。ぜひとも、もう少しスケールアップした状態で30キロ程度を出してもらおうと、大変インパクトがあります。
- 【原田委員】 それを斜めにしているのがみそですね。上だけにガスが流れていきます。
- 【北海道大学：岡部教授】 そうですね。よく観察すると、この部分でこれだけガスがたまっています。水がたまっていない部分があります。その部分から、流入孔といいますか、そこからガスが常時流れる形になっています。どうしてかということ、そのまま縦にしてしまうとエアをかんでしまいますので、水がなかなか流れにくくなると思います。
- 【原田委員】 ベットがどんどん攪拌されてしまうから、ガスだけ逃がすということですか。
- 【北海道大学：岡部教授】 はい。

- 【村上委員】 実廃水による試験について、消化汚泥脱離液の平均数値の表が出ています。亜硝酸になるとずいぶん高い。これは脱離液そのものではなくて、部分硝化をかけた後ということですか。
- 【北海道大学：岡部教授】 そうです。説明が足りませんでした。もともとの廃水は、Y市の消化汚泥をいただき、日立プラントが部分硝化を行いました。その後の廃液です。
- 【村上委員】 それから、実験の継続に伴って、赤い色が薄くなり、活性が落ちたということでした。これはシニカですか、アナモックスの菌叢自体も変わっているのですか。
- 【北海道大学：岡部教授】 いえ、それは確認されていません。同じ種類だと思います。
- 【古川分科会長代理】 今の質疑応答に関係しますが、廃水で2倍希釈までしか行けていないことについて、グラニュールを使ってプラグフローをかけても、かなりガスの攪拌で混ざっていると思います。プラグフローになっているのでその程度しか採れないということですか。
- 【北海道大学：岡部教授】 ご指摘のとおりです。我々がプラグフロー型にした理由は、いくら濃度が高くて、後段に行くにしたがって処理が起きるだろうと考えたためです。これを完全混合にしてしまうと、たぶん濃度が高すぎて処理がうまくいかないと考えてプラグフロー型にしました。初めの3倍希釈では、相応の処理は得られますが、2倍希釈に戻すと、活性が落ちます。たぶん、亜硝酸の濃度が高すぎて亜硝酸阻害がかかっている可能性があると思います。
- 【古川分科会長代理】 内部循環をかけたことがありますか。
- 【北海道大学：岡部教授】 いえ、ありません。我々の場合は、先生が言われたとおり、ガスが相当出るので、内部がミクシングされると考えられます。バイオマスが多量に蓄積していますので、ほんの少ししかバイオマスは動かない状態です。本当のプラグフロー型のリアクタになっています。
- 【古川分科会長代理】 30キロの速度が出た時は、もっと薄い濃度で滞留時間も短くして30キロになったということですか。
- 【北海道大学：岡部教授】 そういうことです。
- 【三谷委員】 例えばリアクタの最適化を考えねばならないと思います。レイノルズ数的には本当はプラグフローではないという気がします。また、グラニュールをぎっしり詰めることが本当によいのか。そういうことも踏まえると、成果全般を通して、ある数字を達成したことを報告されていますが、その値が本当に最適化の結果なのか、チャンピオンデータだ、と言われると受け止め方が変わってくる気がします。いかがお考えですか。
- 【北海道大学：岡部教授】 エンジニアリングの問題だと思います。リアクタの形式については、若干ですが、エアリフト型といいますか、内部で汚泥が循環する形のものや、膨張床型のものも試行しています。高速というか、30キロ程度まで負荷をかけると、窒素ガスが発生します。グラニュールに窒素ガスがついて、ほとんどが上に浮きま

す。これが、こうした循環型のリアクタだと問題になると考えました。我々にはできるだけ、汚泥が流動しない形のパackedベッドにしました。これは基本的にプラグフローなので、濃度プロファイルができ、上部はなかなか有効に使うことができませんが、それでも速度的には、こちらのほうが高く出ると考えています。

報告されている論文等で、このようなパacked型もしくはバイオフィーム型のリアクタで高い速度が得られています。速度を出すにはこのほうがよいと思います。

【三谷委員】 局所的な分解速度と、トータルの速度はまた違います。スケールアップしていった時に、局所的なところを全てラージスケールまで持っていくことができるかが、課題になると思います。先々を考えてどうすれば一番よいのか、そういうことを研究していますか。

【北海道大学：岡部教授】 そこまで答えることのできる知見を持っていません。エアリフト型のリアクタで実用化されていますので、実用化レベルではそれで十分と思います。

【遠藤分科会長】 マイナーな質問ですが、亜酸化窒素の発生について、どうしても部分硝化をしないとアナモックスが成り立たないと思います。そこで、アナモックスの段階では、亜酸化窒素が出ないということによいわけですが、その前の段階で、どうやってそれを発生しないようにするか、何か方法がありますか。

【北海道大学：岡部教授】 我々がグラニュール型の部分硝化リアクタを立ち上げた理由の一つは、 N_2O の生成が、我々が前に使っていたバイオフィームリアクタではやはり高かったです。4%と言いましたが、これは負荷に対して4%であって、酸化された窒素に対しては10%近く出ます。やはり曝気が居所的なところがデッドエンドになってしまって嫌気化することが見られました。これを解消するためには、グラニュールで動かしたほうが N_2O の生成は少ないと考えて、このような形にしました。今日は示しませんでしたが、実際に N_2O の生成は、このグラニュール型のリアクタでは少ない割合になります。完全に N_2O の生成を止めることはできませんが、曝気や、 NO_2 の濃度を制御することによって低くすることは可能と思います。

【古川分科会長代理】 実廃水の処理で、温度を38度にしてしています。先生が集積された汚泥は38度が最適なのか。少し高い気がします。重炭酸カリウムを加えてpHの調整も兼ねていると思いますが、pHはいくつで運転しましたか。

【北海道大学：岡部教授】 38度という温度は少し高いと思います。35~36度程度がこのバクテリアの至適温度ですが、少し高めで運転しました。重炭酸を加えた理由は、廃水の組成といますか、水質から見て少し足りないと考えて加えました。しかし、加えた効果は疑問だと思います。pHは7.5程度で入り、最終的には非常に高いアナモックス活性がありますので、8程度で推移していると思います。

【遠藤分科会長】 またマイナーな質問で申し訳ありませんが、ペニシリンGを使って脱窒菌を除菌したと説明されました。アナモックス菌は、ペニシリンGの影響を受けないということによいですか。

【北海道大学：岡部教授】 はい、我々が検証したわけではありませんが、文献等によりますと、他の細菌とは違う膜構造を持っていますので、ペニシリンGが効きにくいという知見があります。そのため、ペニシリンGを使いました。

【遠藤分科会長】 わかりました。ありがとうございます。大体時間が来ましたが、よろしいですか。それでは、次のご説明に移ります。

(2)電力中央研究所

実施者より資料7-2-2に基づき説明が行われた後、以下の質疑応答が行われた。

【原田委員】 メタン発酵槽の酸化還元電位がマイナス 0.8 ボルトですか、これは電極の近傍ですか。

【電中研：松本上席研究員】 電極の近傍です。

【原田委員】 液はどの程度ですか。

【電中研：松本上席研究員】 液は、測定しますと、通常メタン発酵と大差ない値でした。マイナス 0.4 ボルト付近です。有用な微生物を保持している、担体の近傍でベストな環境が構築されている、そこから有用な菌が常時提供されているという仕上がりになっていると考えています。

【原田委員】 わかりました。電極は汚れませんか。これは固形物のメタン発酵を対象にしていますが、いかがですか。

【電中研：松本上席研究員】 バイオフィームができる、フロックが付着することはありますが、それによって電気が流れなくなることはありません。

【原田委員】 何時間連続運転をしたのですか。その間、電極を洗う操作は全くありませんか。

【電中研：松本上席研究員】 洗いません。容量 250ml の通電型メタン発酵槽では 80 日ほどかけて運転します。

【原田委員】 それから、電極から微生物に電子を供給するという効果はないですか。

【電中研：松本上席研究員】 そのような効果を否定はできません。ただ、電子が微生物の呼吸に必要なであるといったファクターはメインではないと思います。流れる電流値から換算しても、それが微生物の呼吸を賄うに十分とは到底思えません。

【原田委員】 そうすると、効果は、酸化還元電位をより還元側にする、電極で微生物の保持をよくするというその2つがメインであるということですか。

【電中研：松本上席研究員】 その2つがメインだと考えています。

【原田委員】 わかりました。

【安井委員】 電気化学のことはわからないため、おかしな質問かもしれませんが、通電していないほうのガス生成速度が下がったということでした。これはVFAが蓄積したうえでガス発生が低下ですか。プロピオン酸や吉草酸、酪酸、そういうものがたまって。

- 【電中研：松本上席研究員】 そうです。そういうことになります。
- 【安井委員】 メタン発酵の手前のところで、例えばプロピオン酸の分解反応において、生成の水素分子が電気分解されることで反応が進むということではないのですか。
- 【電中研：松本上席研究員】 そうです。そういう現象も起こる可能性はあるとは思いますが、電流値から見て、それほど大きな電流が流れていないことから、積極的にそうした反応が系を安定化させたというよりも、むしろ別のファクターであると考えています。
- 【古川分科会長代理】 使われたリアクタについて質問します。これは連続で行ったのですね。
- 【電中研：松本上席研究員】 はい、連続で行っています。
- 【古川分科会長代理】 流入水と処理水をポンプで引っ張っています。そのところは膜が入っていますか。
- 【電中研：松本上席研究員】 ここは、膜は入っていません。
- 【古川分科会長代理】 では、ケモスタットで運転しているということですか。
- 【電中研：松本上席研究員】 はい。
- 【古川分科会長代理】 定量的な PCR の結果で、高負荷時でも同様の微生物濃度を維持という結果は、ケモスタットであれば、負荷が高まれば、普通は菌の数が変わってよいはずです。変わっていないのは、通電した影響ですか。
- 【電中研：松本上席研究員】 ここは少し説明不足でした。担体上の微生物濃度です。
- 【古川分科会長代理】 発酵液中というものもありますね。
- 【電中研：松本上席研究員】 はい。失礼しました。
- 【古川分科会長代理】 発酵液中と担体中で両方とも、全菌も古細菌もあまり変わらないというのは。
- 【電中研：松本上席研究員】 ケモスタットで流入・排出が早くなったといっても、1.5 日程度です。
- 【古川分科会長代理】 1.5 日と、水理学的な滞留時間が 10 日とでは、負荷が 7 倍程度違いますね。
- 【電中研：松本上席研究員】 そうです。
- 【古川分科会長代理】 そうすると、普通のケモスタットでは、少なくとも 5 倍くらい菌の量が変わっていなければいけないと思います。それが変わらないのはどういう理由かということ。通電することによってそうなり、汚泥が減って、活性が高まるということであれば非常に面白いと思います。
- 【電中研：松本上席研究員】 その辺は、詳細なシミュレーションが必要かもしれません。今のところは、こうした結果が出ているという状況です。流入・排出が早くなった時、それに合わせて担体から効果的な菌の供給が行われている可能性があるのかどうか、今は何とも言えません。
- 【古川分科会長代理】 このリアクタですと、下はスターラーで攪拌しているのですね。

- 【電中研：松本上席研究員】　そうです。ここで攪拌しています。
- 【古川分科会長代理】　スケールアップした時にどういった攪拌にするか、このリアクタでは、それで済みますが、スケールアップが少し難しいと思います。
- 【電中研：松本上席研究員】　そこは検討の余地があります。ただ、この部分、この外枠を除いた部分が一つのモジュールのような形で、既存のリアクタに投げ込む形で、電気をかけたリアクタが成立するイメージに仕上がっています。その辺から、どう最適化していくかという検討が必要だと思います。
- 【村上委員】　大変面白い成果です。容積当たりの電力も、この数字で見るとそう大きくないですが、これが実際に 2,000m³や 3,000m³にスケールアップすると大きな数字になります。これは継続的に通電しています。例えば間欠で通電した場合はどうか、担体がいくつかありましたが、それを順番に通電して同じ効果があるかなど、消費電力の最適化を行うための検討は何か行いましたか。
- 【電中研：松本上席研究員】　非常に有益なご指摘をありがとうございます。ご指摘された内容の検討はもちろんあり得ると思います。その前段階としてですが、2,000m³、3,000m³にした時にどの程度か、試算してみました。単純に電力が比例的にかかると想定しますと、この下水をいただいたところでの 2,000m³、3,000m³に適用した場合、そちらでメタン発酵を、今、ガスとして採っていますが、そのうちの一部で発電しているようです。その発電量の 3%程度の電力で賄える値です。
- そうであっても電力は抑えたほうがよいと思います。ご指摘のように、間欠式にできないか、あるいは、単位体積当たりもっと少ない面積のユニットでも成立するのではないかと、そうした条件も変えることができます。そうしたベストのリアクタのデザインが計算できると思います。まだそこまでは踏み込めていませんが、そうしたことは検討項目として考えられます。
- 【三谷委員】　最初のお話しは、固定床を使って、電気を使って、生ゴミを想定した仕事をするというものであったと思います。今回実験に用いた材料は生ゴミとして想定されるようなものですか。
- 【電中研：松本上席研究員】　ここでは、実験条件のばらつきを極力なくするため、ドッグフードを生ゴミと見立てて、スラリー状にして実験しています。
- 【三谷委員】　中間評価の際にもどなたか先生が言われたと思いますが、生ゴミの成分は幾つかあります。例えばセルロース系もありますし、油脂系のものも入っています。そういう組成とよく似ているという前提ですか。
- 【電中研：松本上席研究員】　そうです。
- 【三谷委員】　メタンの生成はメタン生成反応部分だけではなくて、前段の糖質等の分解が進んで起こります。反応速度的に言うと、生ゴミ、即ち、「対象としているどの基質分解の一番の律速段階は何処になるので、だからこのメタン生成速度は短縮できる。よってメタン生成速度の向上は合理的です。」という説明の仕方ではいかがですか。

- 【電中研：松本上席研究員】 基本的には、高速での処理を考えると、後段が律速になると考えています。基本的にはメタン発酵のメタン菌濃度です。そちらについて、今回、特に安定化し、酸化還元電位等が安定化に効いたということで、そこが活性化されたというよりは、活性が落ちずに維持できたということになると思います。そうした効果が今回のデザイン化として見えたのではないかと思います。
- 【三谷委員】 固形分の溶解の部分はあまり考えなくてもよいということですか。どっちにしてもメタン発酵で、供給した基質が全部分解できるわけではなく、いくらか沈殿物や残渣が出てくると思います。その部分は処理しないといけません。ただ、可溶化された部分に関しては高速でメタン化できるというような、概略的な尋ね方で恐縮ですが、そういうイメージですか。
- 【電中研：松本上席研究員】 時間的、予算的制約から検討項目を厳選したためリアルの生ゴミとしての検討が、この5年間では不十分だったと言わざるを得ません。生ゴミといっても様々な種類があります。そうした場合、場合についての最適化の検討がこの先は必要になってきます。
- 【三谷委員】 もう1点お尋ねします。実廃棄物を使い、いくつかの条件を付した試験をしています。一つ一つの実験条件の期間、試験期間はどの程度ですか。
- 【電中研：松本上席研究員】 基本的には、200日ほどです。
- 【三谷委員】 例えば右上の図にHRTが20というものがあります。これを200日程度ということですか。
- 【電中研：松本上席研究員】 通常、HRTの3倍期間安定であれば、メタン発酵が成立していると見なすことができるという考えから、基本的に同じ負荷量では、少なくともHRTの3倍程度の期間を目安に維持して次のステップに移っています。事業原簿の-2-5-25ページを見ていただくと、どの段階でどの程度かけているか、わかります。大体、20日前後、同じ負荷量で運転しています。それで、トータルの実験として200日程度実施したということです。
- 【遠藤分科会長】 実廃水あるいは下水汚泥で固定床を適用するメタン発酵は、通常はあまりないかもしれませんが、高濃度の廃水のメタン発酵はあり得ます。その時に、この通電型のリアクタは固定床のようですので、その固定床にした場合との比較はどうですか。既存設備とは、要するに通常の汚泥消化タンクのことですね。
- 【電中研：松本上席研究員】 そうです。
- 【遠藤分科会長】 それと比較して、廃水処理ではないため、汚泥処理ということですが、廃水処理などを想定した場合、固定床の場合、高いCOD負荷が通常ではないかという気がします。例えば、5とか6g/L・日ぐらいが普通ではないかと思います。同じ固定床で比べる必要があると思いますが、いかがですか。
- 【電中研：松本上席研究員】 その辺はご議論があるかもしれません。プロジェクト開始当初の考え方は、担体を使う効果プラス通電の効果、これで既存のものから3倍、50%

の面積低減を目標にスタートした経緯があります。スタート当初の約束に基づいて計算しています。

【遠藤分科会長】 そうですか。固定床にした場合にインシャルコストが相当かかると思います。そうなった時に、4.5 倍の負荷になったということは、同じ固定床である従来の固定床プロセスと比較すれば、4 倍にはならないかもしれないと思い、質問しました。当初のプロジェクトの提案がこうであったということですね。

【電中研：松本上席研究員】 はい。

【遠藤分科会長】 わかりました。時間が少しオーバーしましたが、ほかにご質問がなければ、第 5 議題に関してはここまでとさせていただきます。

6. 全体を通しての質疑

全体を通しての質問がなかったため、質疑は行われなかった。

7. まとめ・講評

【遠藤分科会長】 では、議題 7 「まとめ・講評」です。各委員の皆様、講評を安井委員から順番にお願いします。

【安井委員】 全体を通した感想も含めて講評させていただきます。当初の NEDO プロジェクトの目標は、好気処理においては性能向上、省エネ、高効率。嫌気においては適用拡大、高負荷がキーワードでした。5 年の中でご研究されて、今日お話を伺うと、例えば活性汚泥法の中での亜硝酸型硝化あるいは N_2O 。嫌気の中ではゴミ処理といったところに、問題点が多少絞り込まれた形で進められたと理解しています。

技術的、学術的にチャレンジングなトピックを各担当者が選び、実用化も同時に目指しています。基礎研究も踏まえたものは文科省の科研費ベースの研究になると思いますが、NEDO プロジェクトの場合は実用化も要請されます。バランスよく折り合いをつけて、チャレンジングな目標設定をされたと思います。ただ、性能の試算が、どうしてもラボスケールでの研究ベースになっています。アカデミックな部分は非常に迫力がありますが、速度としてどの程度とれているかとなると、発表を伺うと、若干、自信がなさそうな印象を受けました。しかしながら、この部分は世界初の性能である、この部分は世界初の知見であると、自信を持って説明していただいたことはとても良いと思います。以上です。

【村上委員】 今日は、熱心なご説明をありがとうございました。このプロジェクトの目標は、初めにご説明があったように、省エネ効果、廃棄物の大幅削減、基盤技術の確立ということです。必ずしもすぐに実用化ということではないかもしれませんが、私は下水道の実務に携わっている関係で、実用化の可否に一番興味があります。

非常に先端的なプロジェクトで、様々なことができているという印象を受けました。しかし、実用化という観点から見ると、実用化に相当近いテーマと、もう少し

かかると思うテーマ、いろいろあったと思います。実用化から少し遠いと思われるテーマも、非常に先端的な技術ですので、これからも研究を継続して、実用化に持っていくレベルまでぜひ高めてほしいと思います。

昨年の大震災以来、下水道を取り巻くエネルギー事情が激変しました。これまでも省エネに取り組んできましたが、念仏のように省エネと言っていればよいということではなく、積極的に対応していく必要が出てきました。ぜひ、ここまで来たすばらしい技術を実用化に結びつけるよう、お願いします。

【三谷委員】 本日は、先端的な話から始まり、幅広いご研究、ありがとうございました。若干、感じたことを申し上げます。

今、2人の先生からお話がありましたように、良い研究をされています。実用化といっても、恐らく、全部の研究を何にでも適用できるというのではなく、あるところにこれは非常に絞り込めますとか、ここに適用すると非常に優位性がありますということだと思います。恐らく、皆さん感じられていると思います。できれば、そういう部分を強くアピールしてほしいと思います。NEDOとして、費用を使って仕事をしていく以上、最終的には国民にわかりやすい説明が必要だと思いますので、ぜひ、そういうアピールをしていただければと思います。

冒頭のNEDOからの説明で、市場のさらなる発展と書いてありました。恐らく、国内だけではなくて海外を目指す、また途中で、先生方からも、途上国では非常にニーズが高いという話がありました。そういうことも含めてアピールポイントをぜひ主張してもらおうとよいと感じました。以上です。

【原田委員】 いずれも意欲的な研究課題に取り組み、すばらしい成果が出ています。この結果から新しいイノベーションがいくつか出てくると期待しています。廃水や廃棄物処理はコストとのトレードオフです。新しい何かを、今までの単純なプロセスに入れると、どうしてもコストがかかります。その部分は、実用化の大きなハードルになるので、もう少し取り組んでいただくことも大事だと思います。

藤田 PL が示した一気通貫型のシステムはイメージとしてわかりやすいのですが、それぞれの研究が違った目的で進められており、つながるものもあれば、つながらないものもあって、難しい課題があると思います。この研究から出てきたいくつかのすばらしい成果は、世界に誇ってもよいと思います。先ほども申し上げましたが、日本の特許だけではなく、国際的に戦うことのできる技術のイノベーションが出てきていると思うので、ぜひ、そちらも積極的に考えてほしいと思います。

【古川分科会長代理】 今までの委員の先生方が言われたこととほとんど同意見ですが、タイトルからすると、微生物群をデザイン化して高効率なリアクタを開発することが本来の目的であると思います。学問的には非常に面白く、論文をいくつも書くことができそうなテーマが多いのですが、実用化をにらんだ場合、固定化の部分は亜硝酸化のところと DHS 以外は、実用化までには越えなければならない大きなデスバレ

ーがまだあるように思います。シーズとしては非常に良いものがあるので、プロジェクト終了後も、実用化に結びつけるべく研究を継続して、日本発の新しい技術として情報発信されることを希望します。以上です。

【遠藤分科会長】 ありがとうございます。では、最後に私から一言申し上げます。本日は、研究事業の内容を詳細に、わかりやすく説明していただき、ありがとうございました。全体的には、数多くの成果をおさめたプロジェクトであると評価します。

ただ、微生物群のデザイン化という全体目標に対して、廃水や廃棄物処理、微生物生態系の人工的構築、人工的制御を課題にしてきたということで、そういう観点を重視してもう一度整理して取りまとめると、より理解しやすくなると思います。せっかく良い成果があがっていると思いますので、理解しやすくなることによって、得られた成果が、より広く、そして、より有効に利用されるようになると思います。

以上ですが、推進部長あるいはプロジェクトリーダーの藤田先生から何か最後に一言ございましたら承ります。

【大阪大学：藤田教授(PL)】 推進してきた側の代表ということではありませんが、まとめ役として一言述べさせていただきます。単にお礼ということで申し上げてよいのかもしれませんが、非常に厳しいご意見もいただきましたし、温かいご意見もいただきました。また、個々の推進する研究者にとっても、今後の研究に資するコメントもいただき、非常にありがたく思います。

私も、個人的に考えることは、各委員の先生方が述べられたように、現在、日本の水処理も含めて環境バイオ型の処理会社が非常に元気を失っている部分があることです。我々の技術を外に持って打って出ないといけない環境が来ていると思います。従来技術に様々な付加的なもの、あるいは、本日発表した微生物のデザイン化という先端的な知見も加えて、途上国でも戦うことのできるコスト意識がある実用的な技術に磨きをかけていき、できれば打って出たいと思います。

それは、我々推進者側が単独でできることではありません。先ほどもご指摘がありましたように、NEDO がいかに我々の成果を上手に知らせていって、1社でも2社でも、関心がある企業が共同研究を希望し、成果をさらに進めていってほしいと思います。必ずこういう技術が世界に打って出ていくことができると思います。コストについても、技術についても戦うことのできるものに仕上がっていくと思います。

本日は、委員の先生方、素晴らしいご意見をいただき、ありがとうございました。

8. 今後の予定
9. 閉会

配布資料

| 資料番号 | 資料名 |
|----------|--|
| 資料 1-1 | 研究評価委員会分科会の設置について |
| 資料 1-2 | NEDO 技術委員・技術委員会等規程 |
| 資料 2-1 | 研究評価委員会分科会の公開について (案) |
| 資料 2-2 | 研究評価委員会関係の公開について |
| 資料 2-3 | 研究評価委員会分科会における秘密情報の守秘について |
| 資料 2-4 | 研究評価委員会分科会における非公開資料の取り扱いについて |
| 資料 3-1 | NEDO における研究評価について |
| 資料 3-2 | 技術評価実施規程 |
| 資料 3-3 | 評価項目・評価基準 |
| 資料 3-4 | 評点法の実施について (案) |
| 資料 3-5 | 評価コメント及び評点票 (案) |
| 資料 4 | 評価報告書の構成について (案) |
| 資料 5 | 事業原簿 (公開) |
| 資料 6 | プロジェクトの概要説明資料 (公開) 4.1 事業の位置付け・必要性及び研究開発マネジメント 4.2 研究開発成果及び実用化の見通し |
| 資料 7-1-1 | プロジェクトの詳細説明資料 (公開) 5.1.1 好気性処理 (1) 日立プラントテクノロジー |
| 資料 7-1-2 | プロジェクトの詳細説明資料 (公開) 5.1.1 好気性処理 (2) 広島大学 |
| 資料 7-1-3 | プロジェクトの詳細説明資料 (公開) 5.1.1 好気性処理 (3) 北海道大学 (地球環境科学研究院) |
| 資料 7-2-1 | プロジェクトの詳細説明資料 (公開) 5.1.2 嫌気性処理 (1) 北海道大学 (工学研究院) |
| 資料 7-2-2 | プロジェクトの詳細説明資料 (公開) 5.1.2 嫌気性処理 (2) 電力中央研究所 |
| 資料 8 | 今後の予定 |

以上

参考資料4

評価結果を受けた今後の取り組み方針について

評価結果を受けた今後の取り組み方針について

| 評価における主な今後の提言 | 今後の取り組み方針 |
|--|---|
| <p>○生物学的廃水・廃棄物処理の新技术の研究と開発に本プロジェクトの成果がどのように利用できるかを明示することが必要と考えられる。今後、有望な新規技術が開発されたことを実施者は広く PR して、積極的な情報提供を図って欲しい。</p> <p>○実用化イメージにおいて、一気通貫型システムが提案されているが、本プロジェクトで開発した技術の実用化においては、この形だけにこだわらず、各構成技術の個別の実用についても、ニーズがあれば積極的に推進して行くべきである。</p> | <p>○プロジェクトに参加した研究機関・企業は、引き続き水環境学会、農芸化学会等の関係学会において本プロジェクトや継続的な研究の成果を発表し、情報提供を行う。</p> <p>○下水道展等の水処理に関連した展示会で、各構成技術についても PR を行うことを通してニーズを調査し、これを踏まえて実用化について検討を進めていく。</p> |

本研究評価委員会報告は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）評価部が委員会の事務局として編集しています。

平成24年10月

NEDO 評価部

部長 竹下 満

主幹 三上 強

担当 梶田 保之

* 研究評価委員会に関する情報は NEDO のホームページに掲載しています。

(http://www.nedo.go.jp/introducing/iinkai/kenkyuu_index.html)

〒212-8554 神奈川県川崎市幸区大宮町1310番地

ミュージアム川崎セントラルタワー20F

TEL 044-520-5161 FAX 044-520-5162