

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 11 月 1 日(01.11.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/147553 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 63/04 (2006.01) C02F 3/34 (2006.01)
C02F 3/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C02F 3/28 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/060256
- (22) 国際出願日: 2012 年 4 月 16 日(16.04.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-102565 2011 年 4 月 29 日(29.04.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島 3-2-4 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菅谷 剛彦 (SUGAYA Takahiko) [JP/JP]; 〒5660072 大阪府摂津市鳥飼西 5-1-1 株式会社カネカ内 Osaka

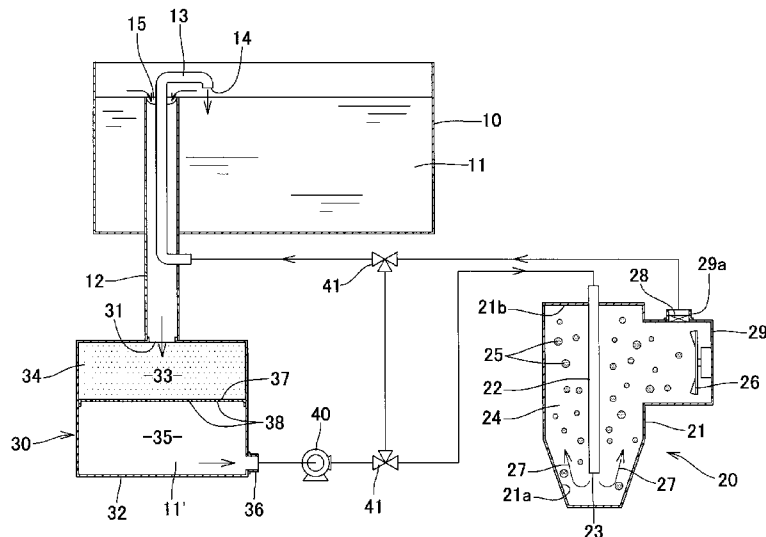
- (JP). 藤原 浩 (FUJIWARA Hiroshi) [JP/JP]; 〒8120018 福岡県福岡市博多区住吉 4-2-1 5 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 柳野 隆生, 外 (YANAGINO Takao et al.); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原 1-1-5 1、ノスクマードビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

[続葉有]

(54) Title: WATER PURIFICATION METHOD AND LIQUID FOR WATER PURIFICATION

(54) 発明の名称: 水浄化方法および水浄化用液

[図1]



(57) Abstract: The present invention can efficiently reduce nitrates, nitrites, etc. generated in nature such as swamps, ponds, lakes, rivers, seas, and marshy places or in aqueous environments of artificial devices such as ornamental or aquaculture water tanks, and can suppress the occurrence of mosses, etc. by a liquid for water purification obtained by applying an external force to a culture solution comprising raw water containing a microbial group including anaerobic microbes and particles composed of polyhydroxyalkanoate after the start of culture by the end of the culture to destroy at least part of biofilms formed on the surfaces of the particles.

(57) 要約: 嫌気性微生物を含む微生物群を含有する原水とポリヒドロキシアルカノエートからなる粒子とを含む培養液に対して、培養の開始後終了までの間に、外力を負荷して前記粒子表面に形成されたバイオフィームの少なくとも一部を破壊してなる水浄化用液により、例えば、沼、池、湖、河川、海、湿地帯等の自然界や、観賞用や養殖用等の水槽等の人工装置の水環境において生じる、硝酸塩、亜硝酸塩などを効率良く低減したり、コケ類等の発生を抑制することができる。

WO 2012/147553 A1



ロツパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：水浄化方法および水浄化用液

技術分野

[0001] 本発明は、水浄化方法および水浄化用液に関し、更に詳しくは、ポリヒドロキシアリカノエート（以下、「PHA」ともいう。）を用いた沼、池、湖、河川、海、湿地帯、水槽等の水浄化方法および水浄化用液に関する。

背景技術

[0002] 沼、池、湖、河川、海、湿地帯等の自然界、観賞用や養殖用等の水槽等の人工装置の水環境では、各種の生物が生存している。そして、これらの水環境中では、例えば脊椎動物などの排泄物、その死骸などに含まれる蛋白質や核酸などの窒素原子を含有する有機物が好気性微生物などにより分解されたり、無脊椎動物などから直接排泄されたりすることによりアンモニアが生成しているが、このアンモニアはその水環境中に存在する微生物により、硝酸塩、亜硝酸塩に変換されたり、更には窒素に変換され大気中に放出される。また、生物の排泄物や死骸に含まれるリン原子を含有する有機物などは、各種の微生物により変換され、水環境中あるいは土壌中にリン酸塩などとして生成されることが知られている。

[0003] ところで、従来より、活性汚泥、メタン発酵、浄化槽などによる廃水処理では、上記のような微生物の作用を利用した方法が用いられており、また、各種の微生物の機能に着目して汚染環境を修復する試みがなされている。しかしながら、例えば、観賞用や養殖用などの閉鎖系の水槽内や、水流の滞る自然環境下では、水生生物による排泄物、餌の残渣などは微生物などによる作用の結果、ある程度、窒素に変換されるものの、硝酸塩などが水環境中に蓄積する場合がある。その結果、自然環境下であれば、多量のコケ類等が発生して浮遊することで水が濁ったり、有害なアオコなどが発生したり、水槽の場合であれば、コケ類などが発生し、水槽などの内壁面へ付着したり、浮遊したりする場合がある。

[0004] この対策として、例えば水槽内の硝酸塩などの濃度を下げ、且つ濁りを抑制するため、特定の微生物を用いる方法（非特許文献1）、微生物の栄養源となる成分として生分解性ポリマーのペレットを用いる方法（非特許文献2）が提案されている。また非特許文献2では、生分解性ポリマーのペレットを充填したリアクターを用い、水槽内の水を水槽と当該リアクターとの間で循環させる方法が提案されている。

[0005] しかし、非特許文献1に記載の方法では、適切な微生物を選択しなければ、所望の水浄化効果が得られないという問題がある。また、自然界や人工装置の水環境に適した特定の微生物を選択することは、實際上極めて困難である。また、非特許文献2に記載の方法では、ペレットの表面にバイオフィルムが形成され、一定の水浄化効果は得られるものの、例えば硝酸塩の処理効果は頭打ちとなるうえ、その後、硫化水素が発生する場合があります、却って水環境の低下を招く場合があります。また、非特許文献2に記載のリアクターでは、リアクター内の水を水槽に戻すリアクター出口の辺りでペレットが詰まったり、一部ペレットが固まったりして管理が困難になる場合があります。

[0006] また、例えば、観賞用あるいは養殖用の水生生物の飼育を行う水槽では、水槽中の水の硝酸塩濃度は50mg/L以下が好ましいと一般的に言われており、さらにコケの大量発生を抑制するには、硝酸塩濃度は10mg/L以下が好ましいとされている。しかし、非特許文献1、2に記載の方法では、必ずしも、硝酸塩濃度を十分に低減することができていないのが現状である。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：コーラルフィッシュ、エイ出版社、平成23年4月10日、第31号、p111

非特許文献2：コーラルフィッシュ、エイ出版社、平成23年2月10日、第30号、p85

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 上記問題点に鑑みて、本発明の目的とするところは、例えば、沼、池、湖、河川、海、湿地帯等の自然界や、観賞用や養殖用等の水槽等の人工装置の水環境において生じる、硝酸塩、亜硝酸塩などを効率良く低減したり、コケ類等の発生を抑制することが可能な水浄化用液及び水浄化方法を提供することにある。また、例えば非特許文献2に記載のように、水槽内の水環境を浄化するために、ペレットなどの粒子を充填したリアクターを使用する場合に、リアクター内の液を水槽に戻す際に、リアクターの排出口やその近傍で粒子などが詰まったり、固まったりすることを抑制することが可能で簡便な水浄化方法および当該方法に使用する水槽用リアクターを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、例えば水生生物を飼育している水槽より採取した原水と、ポリヒドロキシアルカノエートからなる粒子とを含む培養液に対して、培養の開始後終了までの間に、例えば攪拌などにより外力を負荷して、PHA粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊して得られる培養液を、原水を採取した元の水槽に投入する（戻す）と、水槽内の水の硝酸塩濃度が著しく低下すること見出し、本発明を完成するに至った。本発明の要旨は以下のとおりである。

[0010] (1) 嫌気性微生物を含む微生物群を含有する原水とポリヒドロキシアルカノエートからなる粒子とを含む培養液に対して、培養の開始後終了までの間に、外力を負荷して前記粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊してなる水浄化用液。

(2) 前記ポリヒドロキシアルカノエートが、ポリ(3-ヒドロキシブチレート- α -3-ヒドロキシヘキサノエート)である前記(1)記載の水浄化用液。

(3) 前記外力が、攪拌及び／又は振動により負荷される前記(1)又は(2)に記載の水浄化用液。

(4) 自然界または人工装置の水環境から採取した、嫌気性微生物を含む微生物群を含有する原水と、ポリヒドロキシアルカノエートからなる粒子と、を混合して培養を開始した後培養終了までの間に、外力を負荷して前記粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊して得られた培養液の少なくとも一部を、前記原水を採取した前記水環境に投入する水浄化方法。

(5) 培養を開始後培養終了までの間に、前記外力を2回以上負荷する前記(4)に記載の水浄化方法。

(6) 前記ポリヒドロキシアルカノエートが、ポリ(3-ヒドロキシブチレート- α -3-ヒドロキシヘキサノエート)である前記(4)又は(5)に記載の水浄化方法。

(7) 前記人工装置の水環境が、水生生物を飼育している水槽内の水を含む水環境であり、前記培養液が投入された後の前記水槽内の水の硝酸塩濃度が0~50mg/Lである前記(4)~(6)何れかに記載の水浄化方法。

(8) 水生生物を飼育している水槽内の水を取水し、この取水した水を用いて培養して得られる培養液の少なくとも一部を、前記水槽内に投入するための水槽用リアクターであって、

前記取水した水とポリヒドロキシアルカノエートからなる粒子とが充填された培養槽と、

前記培養槽から前記水槽へと培養液を排出するための排出口と、

前記粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊するための外力を負荷する手段と、

を備えた水槽用リアクター。

(9) 前記ポリヒドロキシアルカノエートが、ポリ(3-ヒドロキシブチレート- α -3-ヒドロキシヘキサノエート)である前記(8)記載の水槽用リアクター。

(10) 前記排出口の近傍に、前記排出口が閉塞することを防止する手段をさらに備える前記(8)又は(9)に記載の水槽用リアクター。

(11) 前記(8)～(10)の何れかに記載の水槽用リアクターを備えた水槽。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、例えば、沼、池、湖、河川、海、湿地帯等の自然界や、観賞用や養殖用等の水槽等の人工装置の水環境において生じる、硝酸塩、亜硝酸塩などを効率良く低減したり、コケ類等の発生を抑制することが可能である。また、水槽内の水環境を浄化するために、ペレットなどの粒子を充填したリアクターを使用する場合に、リアクター内の液を水槽に戻す際に、リアクターの排出口やその近傍で粒子などが詰まったり、固まったりすることを抑制可能で、簡便な水浄化方法および当該方法に使用する水槽用リアクターを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明の水槽用リアクターを備えた水槽の実施形態の一例を示した図である。

[図2]本発明の水槽用リアクターを備えた水槽の実施形態の他の例を示した図である。

[図3]実施例1～5および比較例1、2における水槽内の水の硝酸塩濃度の経時変化を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明につき、さらに詳細に説明する。

[0014] 本発明の水浄化用液は、嫌気性微生物を含む微生物群を含有する原水とポリヒドロキシアルカノエート(PHA)からなる粒子とを含む培養液に対して、培養の開始後終了までの間に、外力を負荷して前記粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊してなるものである。

[0015] 本発明では、このように、所定の原水とPHAからなる粒子とを混合して培養液とし、培養を開始した後、培養を終了するまでの間に、培養液に対して外力を負荷し、培養液内のPHAの粒子の表面に形成したバイオフィルムを破壊する処理を行う。培養の過程においては、原水に含まれる微生物群の

中でも、先ず、P H A粒子の表面でP H Aを資化しつつ、好気性微生物が優勢的に増殖してP H A粒子表面にバイオフィームが形成される。このバイオフィームが成長するに従い、バイオフィームには好氣的環境と嫌氣的環境が形成されるため、原水を採取した水環境に生息していた各種の微生物群がバイオフィームに含まれることになる。そして、バイオフィームがさらに成長していくと、バイオフィームの内部は嫌氣的環境になることから、P H A粒子の表面には、嫌気性微生物が優勢に生存する層と当該層の表面に好気性微生物が優勢的に生存する層が形成され则认为られる。そして、嫌気性微生物がP H A粒子の表面全体を覆うことになると、P H Aの分解（資化）が進みにくくなる、即ち、バイオフィームに含まれる各種の微生物の増殖が進みにくくなる。そこで、P H A粒子表面に形成されたバイオフィームを破壊して、P H A粒子表面の少なくとも一部からバイオフィームを剥離して、P H A粒子の表面が培養液に接するようにすることで、バイオフィームに含まれる各種の微生物（主として好気性微生物）が成長する増殖速度の大きい状態を維持しつつ、培養液側に存在する好気性や嫌気性の微生物を含む微生物群の数量も増加させることが可能になると考えられる。

[0016] 上記バイオフィームに含まれる微生物群には、ある種の分類によれば、原生生物（P r o t o z o a）、藻類（a l g a e）、菌類（F u n g i）、細菌（B a c t e r i a）、藍藻（C y a n o p h y t a）が含まれ得る。また、これらの微生物群には、ある種の分類によれば、酸素が生育に必要な好気性微生物（偏性好気性微生物）、酸素が生育を阻害する嫌気性微生物（偏性嫌気性微生物）、酸素の有無にかかわらず生育する通性嫌気性微生物が存在するといわれている。尚、本発明では、通性嫌気性微生物は嫌気性微生物に含まれるものとする。

そして、これら各種の微生物のうち水環境に適した種が増殖し、水浄化作用に寄与するものと考えられている。

[0017] これらの中でも、水環境中の硝酸塩の生成に着目すると、例えば、各種の水環境中に存在する微生物には、アンモニアから硝酸塩への変換を行う偏性

好気性の細菌であるアンモニア酸化菌細菌と亜硝酸酸化細菌、生成した硝酸塩を窒素ガスに変換する嫌気性の細菌である脱窒菌が含まれると考えられる。そして、これらの細菌を含む微生物により、硝酸塩の生成はある程度制御されるものと思われるが、このような微生物の機能を活性化させ、安定して機能させることは必ずしも容易ではない。

[0018] ところが本発明では、上記のように所定の原水とPHA粒子を用いて培養し、培養の過程で意図的にバイオフィルムを破壊して得られる培養液を水浄化用液として使用し、当該水浄化用液を元の水環境に戻すだけで、水環境中の硝酸塩などの濃度を安定して低下させたり、コケ類等の発生を抑制することで、各種の水環境を浄化することができるという極めて顕著な効果を奏するものである。

このような効果が得られる詳細な理由は明らかではないが、元の水環境ごとに適した微生物種や量のバランスがあり、採取した原水を培養することで、その水環境ごとに元々存在する、即ちその水環境に適した各種の微生物をバランスよく増やせるため、元の水環境に投入した際に、投入した水浄化液中に含まれる微生物群の作用により、効率よく浄化することができるものと考えられる。

[0019] 本発明では、上記のように嫌気性微生物を含む微生物群を含有する原水を用いて培養を行う。本発明で原水とは、沼、池、湖、河川、海、湿地帯等の自然界や、観賞用や養殖用等の水槽等の人工装置の水環境から採集したものを意味する。従って、原水には、採取した水環境に応じて、その水環境に適した各種の微生物（微生物群）などが含まれることとなる。また、微生物群には、嫌気性微生物、好気性微生物が含まれ得る。また、上記の自然界には、海などに設けられたエビ等の養殖場、釣堀などのように、一部に人工的な施設を設けた場所が含まれるものとする。

尚、本発明では、原水のことを単に「水」と称する場合がある。

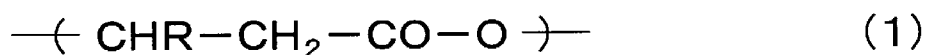
[0020] また、本発明の水浄化用液を、原水を採取した元の水環境に投入する（戻す）ことが好ましい。当該水環境の浄化を図る観点からは、その水環境の浄

化が期待できる場所から採取することが好ましい。例えば、沼、池、湖、河川、海、湿地帯等の自然界に存在する水環境の場合は、局所的に水の流れが滞る傾向にある場所から採取することが好ましい。また、観賞用や養殖用等の水槽等の人工装置の水環境の場合は、人工装置内のみで水を循環させる装置、外部からの流入および外部への排出を行うが装置内での滞留時間が長い装置、などにおける水環境から採取するとよい。本発明の効果をより享受する観点からは、人工装置の水環境から原水を採取するのが好ましく、とりわけ、観賞用や養殖用等の水槽の水環境から原水を採取するのがより好ましい。このような水槽としては、例えば、水族館などで用いられる水槽、観賞用や食用の水生生物を販売する際の展示用の水槽、家庭用の水槽などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。また、このような水槽にて飼育される水生生物としては、特に限定はなく、各種の観賞魚、ハタゴ、ハゼなどの食用魚、海洋性哺乳類、甲殻類、サンゴ、睡蓮などの水生植物、その他の水生動植物などが挙げられ、各種の水生生物を飼育している水槽の水環境に適用可能である。

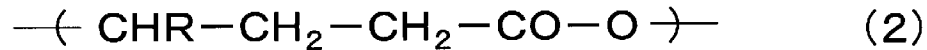
[0021] このような水環境から原水を採取し、所定の培養を行った後に、本発明の水浄化用液を元の水環境に投入する（戻す）ことで、水浄化用液が広範に拡散することなく、水浄化用液に含まれる微生物群の機能が効果的に発揮されるため、元の水環境において硝酸塩などの濃度が低減したり、コケ類等の発生が抑制されたりして、水環境における浄化がより好適に実現される。

[0022] 本発明で用いるポリヒドロキシアルカノエート（PHA）からなる粒子におけるPHAとしては、特に限定はないが、例えば、下記式（1）で示される3-ヒドロキシアルカノエート、下記式（2）で示される4-ヒドロキシアルカノエートよりなる繰り返し単位を有するポリマーが挙げられる。

[0023] [化1]



[0024] [化2]



[0025] (式(1)および(2)中、RはH又は $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ で表されるアルキル基で、 n は1～15の整数である。)

[0026] 式(1)、式(2)のホモポリマーでも良いし、2種以上の組み合わせから成るコポリマー、つまり、ジコポリマー、トリコポリマー、テトラコポリマー、など、またはこれらのホモポリマー、コポリマー等から選ばれる2種以上のブレンド物が挙げられる。中でも、ポリ(3-ヒドロキシブチレート)(PHB)、ポリ(3-ヒドロキシブチレート-コ-3-ヒドロキシバリレート)(PHBV)、ポリ(3-ヒドロキシブチレート-コ-3-ヒドロキシヘキサノエート)(PHBH)、ポリ(3-ヒドロキシブチレート-コ-4-ヒドロキシブチレート)(P3HB4HB)が好ましく、Rが嵩高いために結晶化度が低くなり、嫌気分解の起きやすい非晶部が多いという点でPHBHがより好ましい。

本発明では、既に述べたようにPHAが原水に含まれる独立栄養以外の微生物群により資化される。

[0027] PHAからなる粒子(以下、「PHA粒子」と称する場合がある。)の形状は、特に限定はなく、粉体状、顆粒状、ペレット状等が挙げられ、培養方法、水浄化用液の水環境への投入の仕方、などによって、適宜選択することができる。

また、粒子の大きさとしては、特に限定はなく、同じく培養方法、水浄化用液の水環境への投入の仕方、などによって、適宜選択することができる。

PHAからなる粒子として、粉体状のものをを用いる場合は、表面積を大きくする観点から微粉体とすることが好ましい場合があるが、粉体の大きさが小さすぎると、原水と混合する際に粉体が舞い上がって作業性が悪化する場

合があるため、平均粒径は $50\mu\text{m}$ 以上が好ましい。また、平均粒径は $50\mu\text{m}$ 未満の微粉末の場合は、水に分散した乳化状、懸濁状とすることができる。水に分散した乳化状、懸濁状とすることで、原水との混合時に微粉末が舞い上がることがないため、粒子の平均粒径を $50\mu\text{m}$ より小さくしても作業性を改善することができる。尚、このようなPHA粒子の乳化液は、 $50\mu\text{m}$ 以上の粉体と水道水等の水（原水ではないものを用いるのが好ましい。）との混合液をエンドミルなどでPHA粒子を微細化することで調製することができる。

また、顆粒状、ペレット状の粒子を用いる場合は、表面積を確保する観点から、多孔質状のものを用いるのが好ましい。また、顆粒状、ペレット状の粒子の大きさは、概ね $0.5\sim 10\text{mm}$ とするとよい。また、その形状は、立方体、直方体、筒状体、球状体、楕円状体など各種の構造を用いることができる。

[0028] 本発明では、上記の原水とPHA粒子を混合し、培養を行う。原水とPHA粒子の混合比は、培養した際に、所望期間内に一定以上のPHA粒子の表面にバイオフィームが形成されれば、特に限定はなく、適宜決定することができる。また、外力を負荷する方法によっては、PHA粒子表面に形成したバイオフィームの少なくとも一部が破壊されるようにPHA粒子表面に剪断力が負荷される程度の混合比であればよい。

また、原水とPHA粒子以外に、必要により、微生物群の増殖に寄与する無機塩類やその他の成分を添加しても良い。

[0029] 上記の原水とPHA粒子を混合する際に使用する培養槽としては、特に限定はなく、バッチ式の培養槽を用いても良いし、水環境から原水を連続または断続的に採取（取水）し、連続または断続的に元の水環境へ投入可能な手段を備えた循環式の培養槽であっても良い。

バッチ式の培養槽としては、特に限定はなく、例えば、密封可能な透明もしくは不透明の培養槽の他、フタ付のカップ、ペットボトルといった簡易的なものなどが挙げられる。また、上記の循環式の培養槽としては、微生物の

培養などで一般的に用いられる各種の培養槽を用いることができる。尚、循環式の培養槽の場合、培養槽は、水環境から培養槽へと水環境中の水を取水するための取水口と、培養槽から水環境へと培養液を排出するための排出口とを備えるものとして構成することになるが、PHA粒子が培養槽から排出することを防止するため、培養槽から元の水環境への排出口やその近傍には、フィルターなどのPHA粒子が培養槽内から排出されるのを抑制、防止する手段や、排出口やその近傍でPHA粒子が詰まったり、固まったりすることを抑制、防止するため、攪拌羽などの排出口が閉塞することを防止する手段を設けることが好ましい。

[0030] 本発明では、上記の原水とPHA粒子を混合して培養を開始した後、培養を終了するまでの間に、上記の原水とPHA粒子を混合した培養液に対して、外力を負荷して前記粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊する。これにより、上述したように、培養液中のPHA粒子表面および液中の微生物群の数量を効果的に増加させることが可能となる。

[0031] 上記外力としては、培養液に対して負荷した時に、PHA粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊することができれば、特に限定はない。例えば、培養液を攪拌してバイオフィルムに剪断力を付与する手段、培養液を振動させてバイオフィルムに剪断力を付与する手段、などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。これらの手段は、上記の培養槽の形態に応じて適宜選択することが可能である。

培養槽として、例えば、ペットボトルを使用する場合は、ペットボトル内に適量の培養液を充填し、密栓した状態で、ペットボトルごと振って、内部の培養液を攪拌することで、PHA粒子同士の衝突などにより、PHA粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊し、剥離させることができる。また、ペットボトルより大型で培養槽ごと振ることが困難な場合は、培養槽内に、攪拌翼、邪魔板などを設けて培養液を攪拌したり、培養槽内の水をポンプなどにより水流を起こして、PHA粒子同士を衝突させることなどにより、PHA粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも

一部を破壊し、剥離させることができる。

さらに、上記の循環式の培養槽を用いる場合は、水環境から原水を取水し、同時に培養槽内から培養液を元の水環境に排水する際に生じる液の流れを利用して培養槽内でPHA粒子を対流させて、PHA粒子同士を衝突させることなどにより、PHA粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊し、剥離させることができる。また、同時に培養槽内に攪拌翼、邪魔板などを設けて培養液を攪拌してもよい。

また、何れの培養槽を使用する場合でも、超音波などを用いて培養液を振動させ、キャビテーションによりPHA粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊し、剥離させることができる。

[0032] 外力を負荷する時期としては、特に限定はなく、培養開始後、例えば、PHA粒子表面にバイオフィルムが形成され、使用したPHA粒子の略全ての粒子表面がバイオフィルムで被覆された段階で、最初の外力負荷を行い、その後も、PHA粒子表面のバイオフィルムの形成状況を確認しながら外力の負荷を行うと良い。PHA粒子の表面がバイオフィルムで被覆されると、培養液中の微生物群の増加速度が鈍化する傾向にあるため、バイオフィルムの形成状態が外力負荷時期の指標となり得る。

また、バイオフィルムの形成状況を確認する以外に、培養液中の微生物群の増加速度を概算することも可能である。培養液中の微生物群の増加速度は、例えば、培養液中の微生物群の重量の経時変化を把握することによって概算することが可能である。その方法としては、例えば、経時的に培養液からサンプルを採取し、ろ紙等を用いて微生物群（菌体等）を捕捉するなどして、定法に従って、重量を測定して増加速度を把握することが可能である。

また、上記のように重量の経時変化を求める方法以外には、培養液中の微生物群の菌体数を概算することで、培養液中の微生物群の増加速度を把握することが可能である。菌体数の測定は、寒天等の培地上で培養し、生成したコロニーを数えれば良い。また、嫌気性微生物の数は、市販の嫌気培養パック等を用いて、嫌気条件下で培養し、コロニー数を数えれば良い。例えば、

硝酸塩を減少させる場合、嫌気性微生物の菌体数の増加速度が鈍化した時に外力を負荷してもよい。

本発明において、菌体数の増加速度が鈍化した時とは、培養日数と菌体数の関係をグラフにプロットした時に、傾きがゆるやかになった時を意味する。

[0033] もっとも、バイオフィルムの形成状況などにかかわらず、定期的に外力の負荷を行っても良い。

[0034] 本発明では、外力の負荷を行う時期としては、バイオフィルムの形成状況を考慮しつつ、1～7日に1回行うと良いが、一旦PHA粒子の表面にバイオフィルムが形成した後は、経験的に、好ましくは少なくとも7日に1回、より好ましくは3日に1回、さらに好ましくは1日1回である。尚、培養条件にもよるが、培養開始後で、バイオフィルム破壊のための最初の外力の負荷は、バイオフィルムが相応に形成される培養開始後3日以上経過した後に行うのが好ましい。もっとも、条件によっては、1日でも培養液中の微生物群の増殖は認められる場合はあるため、培養開始後1日で外力を負荷してもよい場合はある。

また、外力の負荷の回数は、特に限定はないが、培養液中の微生物群の数量を増加させて水浄化をより効果的に行う観点からは、培養期間中に2回以上負荷するのが好ましい。

[0035] 培養時の温度は、原水を採取した水環境に準じた温度であれば、特に限定はないが、温度が低すぎると微生物群の増殖速度が下がるため、3℃以上が好ましく、10℃以上がより好ましい。温度コントロールの容易性を考慮すると、80℃以下が好ましい。また、温度コントロールを行うことなく、室温（常温）で行うことも可能である。

[0036] 培養期間は、PHA粒子の形態、大きさ、原水の状況、培養温度等の諸条件により異なるため一概には言えないが、培養液中の微生物群を相応に増殖させる観点からは、3日以上が好ましい。もっとも、条件によっては、1日でも培養液中の微生物群の増殖は認められる場合はあるため、培養期間が1

日であってもよい場合はある。

[0037] 本発明の水浄化用液は、上記のように、原水とP H A粒子とを混合し、所定の処理を行って得られた培養液であるため、培養液中には、バイオフィルムに被覆されたP H A粒子とバイオフィルム外の微生物群が含まれる。この水浄化用液を、原水を採取した元の水環境などに投入する際には、水浄化用液の上澄み液（P H A粒子を殆ど含まない状態の液）を用いても良いし、懸濁状態のバイオフィルムで被覆されたP H A粒子を含む液を用いても良い。P H Aは、生分解性が高いポリマーであるため、各種の水環境中に投入されても、各種の環境中で、分解され、消失しやすいため、元の水環境を悪化させることは殆どないと考えられる。

[0038] 本発明の水浄化方法は、自然界または人工装置の水環境から採取した、嫌気性微生物を含む微生物群を含有する原水と、ポリヒドロキシアルカノエートからなる粒子と、を混合して培養を開始した後培養終了までの間に、外力を負荷して前記粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊して得られた培養液の少なくとも一部を、前記原水を採取した前記水環境に投入するものである。

[0039] 即ち、本発明の水浄化方法は、上述した本発明の水浄化用液（培養液でもある）を、原水を採取した元の水環境に投入する（戻す）ものである。従って、共通する部分の詳細な説明は、省略する。

本発明の水浄化方法においては、元の水環境に投入する培養液の投入方法としては、元の水環境の状況に応じて行えばよい。例えば、原水を用いて予め調製した水浄化用液を、各所に適量ずつ定期的に散布する方法、浄化対象とする水環境の近辺に、1ヶ所以上循環式の培養槽を設置して、連続的または断続的に、原水の採取とともに培養液（水浄化用液）の投入を行う方法などが挙げられる。

また、この際の、培養液（水浄化用液）を元の水環境に投入する量としては、その環境に応じて適宜決定すればよく、一概にはいえないが、一度に多量の培養液を投入すると、原水を採取した元の水環境中の微生物バランスが

崩れる可能性があるため、硝酸塩濃度などを測定し、状況を確認しながら少量ずつ、投入するのが好ましい。

[0040] また、培養液の投入方法によっては、予め調製した培養液（水浄化用液）が減少するため、同じ水環境から原水を再び採取して培養槽に添加してもよいし、必要に応じてPHA粒子も添加してよい。そして、これらを適宜添加した後に、上述したように、外力を付与しつつ、培養を行い、培養液（水浄化用液）を調製するとよい。

[0041] 本発明の水浄化方法を、特に、水生生物を飼育している水槽の水環境に適用した場合、水槽中の水の硝酸塩濃度を0～50mg/Lにすることが可能である。

[0042] 本発明の水槽用リアクターは、主として、上述した本発明の水浄化用液を調製する際に用いた培養槽および、外力を負荷する手段を備えたものである。また、原水を採取する水環境が、水生生物を飼育している水槽内の水環境の場合に特に好適に使用可能である。従って、共通する部分の詳細な説明は、省略する。

本発明の水槽用リアクターは、水槽内からの原水が直接培養槽内に流入するように水槽と接続しても良いし、濾過材システムを介して接続しても良い。濾過材システムでは、原水に含まれる微生物群が濾過材の部分に一部捕捉、維持され、水槽用リアクターへ供給される微生物群の種を調整することができる場合がある。濾過材の材質は特に限定は無く、市販の濾過材を適宜選択して使用することできる。例えば、各種の繊維、多孔質の石、などが挙げられる。また、濾過材において、リン酸塩が堆積する場合があるため、濾過材を定期的に交換すれば、水槽内の水環境からリン酸塩などのリン原子含有物を除去できる場合がある。

[0043] 以下では、本発明の水槽用リアクターおよびそれを備えた水槽の実施形態を、図面をもとに説明する。

[0044] 図1は、本発明の水槽用リアクターを備えた水槽の実施形態の一例を示した図である。図1に示した例では、主要な構成として、水槽10、水槽用リ

アクター２０および濾過材システム３０とを備えたものである。また、図示しないが、水槽には、通気用ポンプ、水槽内の水温を調整するためのヒーター、などの水生生物飼育のための各種の装置を配しても良い。

[0045] 本例では、水槽１０内の原水１１を排水管１２の排水口１５からオーバーフローさせ、濾過材システム３０の濾過容器３２と排水管１２との連結部に設けられた受水口３１から原水１１を濾過材システム３０内に通水させる。原水１１は、濾過容器３２の濾過空間３３に配された濾過材３４を通して、空間３５に至る。本例では、濾過容器３２は、濾過空間３３と空間３５とは複数の小孔３８を備えた分離板３７により分割されている。空間３５内の濾過原水１１'は、排水口３６からポンプ４０により水槽用リアクター２０へ送液される。

[0046] 尚、原水１１の濾過を行わない場合は、濾過材３４を配さないようにしたり、濾過材システム３０全体（符号３０～３８）を用いないようにしたりして構成すればよい。

[0047] 水槽用リアクター２０の培養槽２１には、その略中心部の上部から下部に亘り取水管２２が配され、取水管２２の下部の取水口２３から、濾過原水１１'が培養槽２１内へ送液される。培養槽２１は、筒状の形状を有し、その下部には培養槽内の培養液２４、ＰＨＡ粒子２５が滞留することなく流動することができるように、傾斜面２１ａが設けられている。そして、培養槽２１の略中心部の底部に配された取水口２３から流入する濾過原水１１'が傾斜面２１ａにより上昇流を形成し（図１中の矢印２７参照）、上昇流によりＰＨＡ粒子２５は特に培養槽２１の側壁面部分で上昇する。傾斜面２１ａは、２つ以上の平面にて構成されてもよいし、局面にて構成されてもよく、培養槽２１の形状などに応じて適宜決定することができる。一方上昇したＰＨＡ粒子は、培養槽２１の上部の上壁面２１ｂに突き当たると取水管２２付近で下降し、培養液２４の一部は、培養槽２１の側壁上側に側壁から突出して設けられた排水部２９の排出口２９ａから排出され、水槽１０へと投入される。このように、本例では、上述した培養槽２１内でのＰＨＡ粒子が上昇お

よび下降する際にPHA粒子同士が衝突することで、PHA粒子表面に形成されたバイオフィルムが破壊されることになる。また、図示しないが、他のバイオフィルムを破壊するための構成として、培養槽21内に超音波振動子を配したり、培養槽21の外部から超音波を照射するように構成しても良い。

[0048] また、培養液の温度を調整する場合は、培養槽21内にヒーターを設けても良いし、培養槽21外部にジャケットなどを配しても良い。

[0049] 本例では、上記のように、培養槽21の側壁上側に側壁から突出し、培養槽21内と連通する排水部29を設けている。また、排出部29の上側の壁面には、水槽10へと連通する排出口29aを設けるとともに、フィルター28を設けている。さらに、排出部29の内側側壁部には、攪拌羽26が配され、攪拌羽26が回転することにより、培養槽21内へ向かう流れ、フィルター28へ向かう流れなどが生じ、排出口29aやその近傍（例えばフィルター28）でPHA粒子が詰まったり、固まったりすることを抑制、防止することができる。

[0050] フィルター28は、培養液24（水浄化用液）が通過可能で、PHA粒子25の通過を抑制、防止可能な小孔などが配されていれば、その構成は問わない。

[0051] 水槽用リアクター20の排出口29aから排出された培養液24（水浄化用液でもある。）は、水槽10の注水管13を介して注水口14から水槽10内へ投入される。尚、本例では、注水管13は排水管12内部に配され、注水管12の側壁に設けられた開口部から注水管13の下部が突出するように構成されているが、その他の構成を採用してもよい。

[0052] 以上のような構成により、ポンプ40を作動させて、水槽10内の原水を取水して水槽用リアクター20で培養し、培養液24の一部を水槽10内へ投入することができる。そして、ポンプ40を作動させているうちに、水槽用リアクター20の培養槽21内では、PHA粒子表面へのバイオフィルムの形成とともに、PHA粒子の流動とその衝突により、バイオフィルムの破

壊が連続的、即ち 1 回または 2 回以上起こり、培養槽 21 内の微生物群の増殖が図られる。尚、ポンプ 40 を停止させた場合でも、バイオフィルムの少なくとも一部を破壊して、培養槽 21 内の微生物群の増殖を図る場合は、図示しない他の攪拌羽、超音波振動子を培養槽 21 内に配するなどすればよい。このような構成を採用することにより、断続的な培養液 24 の水槽 10 内への投入も可能である。

[0053] 尚、水槽用リアクター 20 を用いない場合は、濾過材システム 30 の排水口 36 と水槽用リアクター 20 の取水管 22 との間、および、水槽用リアクター 20 の排水口 29a と取水管 13 との間に、それぞれ配された 3 方コック 41 を用いることにより、排水口 36 と注水管 13 とを直接連通させると良い。そして、その間、上述したペットボトルを用いて調製した培養液（水浄化用液）を水槽 10 内に投入するようにしても良い。

[0054] 図 2 は、本発明の水槽用リアクターを備えた水槽の実施形態の他の例を示した概略図である。図 2 に示すように、本実施形態では、図 1 における水槽 10 に代えて、6 台の水槽 10a～10f を使用している点で異なる。濾過材システム 30、水槽用リアクター 20 およびこれらの連結部分の構成は、図 1 に示した構成と実質的に同じであるので、これらの詳細な説明は省略し、同じ構成には同一の符号を付した。また、各水槽 10a～10f、排水管 12a～12f、注水管 13a～13f の構成も、それぞれ、図 1 に示した水槽 10、排水管 12、注水管 13 の構成と同じであるので、詳細な説明は省略する。尚、本例では 6 台の水槽を繋げた例を示しているが、適宜変更することができる。

[0055] 本実施形態では、水槽 10a～10f 内の原水 11a～11f が、全て一つの濾過材システム 30 と水槽用リアクター 20 へと通水される。そして、水槽用リアクター 20 において培養された培養液が水浄化用液として各水槽 10a～10f に投入される（戻される）。尚、図 2 中の各矢印は、流れ方向を示したものである。本実施形態は、同種の水生生物を別々の水槽にて飼育する場合に好適である。

実施例

[0056] 以下に実施例を示し、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

[0057] (硝酸塩濃度測定法)

水槽中の水を定期的にサンプリングし、レッドシー社製「NO₃テスター」を用いて測定した。

[0058] (製造例1) 3HH率12mol%のPHBHの作製

＜遺伝子挿入用プラスミドベクターの作製＞

挿入用DNAとして*A. caviae*の*phaC*のプロモーターおよびリボソーム結合部位を含む塩基配列からなるDNAを次のように作製した。*A. caviae*のゲノムDNAをテンプレートとして配列番号1および配列番号2で示されるプライマーを用いて、PCRを行った。PCRは(1)98℃で2分、(2)98℃で15秒、60℃で30秒、68℃で20秒を25サイクル繰り返し、ポリメラーゼはKOD-plus (TOYOBO製)を用いた。PCRで得たDNA断片を末端リン酸化およびEcoRI消化した。このDNA断片をPac-5P+Ecoとした。

次に、特開2008-029218号公報[0038]に記載のKNK-005AS株の染色体DNAの*bktB*遺伝子の開始コドン直前をDNA挿入部位と設定し、以下の手順で該遺伝子の開始コドンより上流側の塩基配列からなるDNAを作製した。

特開2008-029218号公報[0036]に記載のKNK-005株のゲノムDNAを鋳型DNAの供給源として、配列番号3および配列番号4で示されるプライマーを用いてPCRを行い、*bktB*遺伝子の開始コドンより上流の塩基配列からなるDNAを得た。PCRは(1)98℃で2分、(2)98℃で15秒、64℃で30秒、68℃で30秒を25サイクル繰り返し、ポリメラーゼはKOD-plusを用いた。PCRで得たDNA断片を制限酵素BamHIおよびEcoRIで2酵素同時消化した。このDNA断片をP*bktB*-Bam+Ecoとした。

P A c - 5 P + E c o および P b k t B - B a m + E c o をライゲーションし、ライゲート液中に生成したDNAを鋳型DNAとして配列番号3および配列番号2で示されるプライマーを用いてPCRを行った。PCRは(1) 98℃で2分、(2) 98℃で15秒、60℃で30秒、68℃で50秒を25サイクル繰り返し、ポリメラーゼはKOD-plusを用いた。PCRで得たDNA断片を末端リン酸化およびBamHI消化した。このDNA断片をb P a c - 5 P + B a mとした。

次に、該遺伝子の開始コドンより下流側の塩基配列からなるDNAを作製した。KNK-005株のゲノムDNAを鋳型DNAの供給源として、配列番号5および配列番号6で示されるプライマーを用いてPCRを行い、b k t B 遺伝子の開始コドンより下流側の塩基配列からなるDNAを得た。PCRは(1) 98℃で2分、(2) 98℃で15秒、64℃で30秒、68℃で30秒を25サイクル繰り返し、ポリメラーゼはKOD-plusを用いた。PCRで得たDNA断片を末端リン酸化およびClaI消化した。このDNA断片をO R F - 5 P + C l aとした。

b P a c - 5 P + B a m と O R F - 5 P + C l a をライゲーションし、ライゲート液中に生成したDNAを鋳型DNAとして配列番号3および配列番号6で示されるプライマーを用いてPCRを行った。PCRは(1) 98℃で2分、(2) 98℃で15秒、60℃で30秒、68℃で1分30秒、を25サイクル繰り返し、ポリメラーゼはKOD-plusを用いた。PCRで得たDNA断片をBamHIおよびClaIで2酵素同時消化した。このDNA断片を、ベクターp B l u e s c r i p t I I K S (-) (TOYOBO製)の同制限酵素で消化した部位にサブクローニングした。得られたベクターをb A O / p B l uとした。APPLIED BIOSYSTEMS社製のDNAシーケンサー3130xl Genetic Analyzerを用いて塩基配列を決定し、鋳型としたDNAの塩基配列と同一であることを確認した。

続いて、特開2008-029218号公報[0037]に記載のp S A

C K mを制限酵素N o t Iで処理することによってカナマイシン耐性遺伝子およびs a c B遺伝子を含む約5.7 k bのDNA断片を切り出した。これを、b A O / p B l uの同酵素で切断した部位に挿入して遺伝子破壊・挿入用プラスミドb A O / p B l u / S a c B - K mを作製した。

[0059] <遺伝子挿入株P a c - b k t B / A S株の作製>

次に、K N K - 0 0 5 A S株を親株としてb A O / p B l u / S a c B - K mを用いてb k t B遺伝子の開始コドン直前にp h a Cのプロモーターおよびリボソーム結合部位を含む塩基配列からなるDNAが挿入された菌株を作製した。遺伝子挿入用プラスミドb A O / p B l u / S a c B - K mで大腸菌S 1 7 - 1株 (A T C C 4 7 0 0 5) を形質転換した。得られた形質転換体をK N K - 0 0 5 A S株とN u t r i e n t A g a r培地 (D i f c o社製) 上で混合培養して接合伝達を行った。250 mg / Lのカナマイシンを含むシモンズ寒天培地 (クエン酸ナトリウム2 g / L、塩化ナトリウム5 g / L、硫酸マグネシウム・7水和物0.2 g / L、リン酸二水素アンモニウム1 g / L、リン酸水素二カリウム1 g / L、寒天15 g / L、p H 6.8) 上で生育してきた菌株を選択して、プラスミドがK N K - 0 0 5 A S株の染色体上に組み込まれた株を取得した。この株をN u t r i e n t B r o t h培地 (D i f c o社製) で2世代培養した後、15%のシュークロースを含むN u t r i e n t A g a r培地上に希釈して塗布し、生育してきた菌株を選択して2回目の組換えが生じた株を取得した。さらにP C Rによる解析により所望の遺伝子挿入株を単離した。

この遺伝子挿入株をP a c - b k t B / A S株と命名し、DNAシーケンサー3130xl G e n e t i c A n a l y z e rを用いて塩基配列を決定し、b k t B遺伝子の開始コドン直前にp h a Cのプロモーターおよびリボソーム結合部位を含む塩基配列からなるDNAが挿入された株であることを確認した。

[0060] <c c r遺伝子のクローニング及び発現ユニット構築>

クロトニルーC o Aを、3 H Hモノマーの前駆体であるブチリルーC o A

に変換する酵素をコードする *ccr* 遺伝子を、ストレプトマイセス・シンナモネンシス (*Streptomyces cinnamonensis*) Okami 株 (DSM 1042) の染色体 DNA からクローニングした。配列番号 7 及び配列番号 8 記載の DNA をプライマーとし PCR を行った。その条件は (1) 98℃ で 2 分、(2) 94℃ で 10 秒、55℃ で 20 秒、68℃ で 90 秒を 25 サイクル繰り返し、ポリメラーゼは KOD-plus を用いた。PCR で増幅した断片を精製後、制限酵素 BamHI 及び AflIII で切断した。EE32d13 断片 (J. Bacteriol., 179, 4821 (1997)) を、pUC19 ベクターの EcoRI 部位にサブクローニングし、このプラスミドを BglII と AflIII で切断し、BamHI 及び AflIII 断片とした *ccr* 遺伝子と断片を置換することによって *ccr* 発現ユニットを構築した。

[0061] <phaC 遺伝子のクローニング及び発現ユニット調製>

配列番号 11 を含む phaC 発現ユニットを SpeI 断片として調製した。特開 2007-228894 号公報 [0031] に記載の HG::PRE-N149S/D171G-T/pBlu を鋳型とし、配列番号 9 と配列番号 10 に示すプライマーとして PCR を行った。その条件は (1) 98℃ で 2 分、(2) 94℃ で 10 秒、55℃ で 30 秒、68℃ で 2 分を 25 サイクル繰り返し、ポリメラーゼは KOD-plus を用いた。PCR で増幅した断片を精製後、制限酵素 SpeI で切断して発現ユニットを調製した。

発現ベクター pCUP2-631 は以下のようにして構築した。

C. necator における発現ベクター構築用のプラスミドベクターとしては、国際公開公報 WO/2007/049716 号公報 [0041] に記載の pCUP2 を用いた。まず実施例 7 で構築した *ccr* 遺伝子発現ユニットを EcoRI 処理により切り出し、この断片を MunI で切断した pCUP2 と連結した。次に実施例 8 で作製した phaC 発現ユニットを SpeI 断片として調製し、*ccr* 遺伝子発現ユニットを含む pCUP2 の SpeI 部位に挿入して pCUP2-631 ベクターを構築した。

[0062] <形質転換体の作製>

pCUP2-631ベクターの種々の細胞への導入は以下のように電気導入によって行った。遺伝子導入装置はBiorad社製のジーンパルサーを用い、キュベットは同じくBiorad社製のgap0.2cmを用いた。キュベットに、コンピテント細胞400 μ lと発現ベクター20 μ lを注入してパルス装置にセットし、静電容量25 μ F、電圧1.5kV、抵抗値800 Ω の条件で電気パルスをかけた。パルス後、キュベット内の菌液をNutrient Broth培地(DIFCO社製)で30 $^{\circ}$ C、3時間振とう培養し、選択プレート(Nutrient Agar培地(DIFCO社製)、カナマイシン100mg/L)で、30 $^{\circ}$ Cにて2日間培養して、生育してきた形質転換体を取得した。

[0063] <形質転換体の培養>

上記で作製した形質転換体の培養を行った。前培地の組成は1% (w/v) Meat-extract、1% (w/v) Bacto-Trypton、0.2% (w/v) Yeast-extract、0.9% (w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、および、0.15% (w/v) KH_2PO_4 で、pH6.7に調整した。

ポリエステル生産培地の組成は1.1% (w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.19% (w/v) KH_2PO_4 、0.6% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5% (v/v) 微量金属塩溶液(0.1N塩酸に1.6% (w/v) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1% (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.02% (w/v) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.016% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.012% (w/v) $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.01% (w/v) $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を溶かしたもの。)とした。炭素源としてPKOO(Palm kernel olein、パーム核油オレイン画分)を流加する流加培養にて行った。

それぞれの形質転換体のグリセロールストックを前培地に接種して20時間培養し、2.5Lのポリエステル生産培地を入れた5Lジャーファーマン

ター（丸菱バイオエンジ製MD-500型）に10%（v/v）接種した。運転条件は、培養温度28℃、攪拌速度420rpm、通気量0.6vvmとし、pHは6.6から6.8の間でコントロールした。コントロールには14%のアンモニア水を使用した。培養は65時間まで行った。培養後遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄後、凍結乾燥し、PHBHを得た。

生産されたポリエステルの3HH組成分析は以下のようにガスクロマトグラフィーによって測定した。乾燥PHBHの約20mgに2mlの硫酸-メタノール混液（15：85）と2mlのクロロホルムを添加して密栓し、100℃で140分間加熱して、PHBH分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに1.5gの炭酸水素ナトリウムを少しずつ加えて中和し、炭酸ガスの発生がとまるまで放置した。4mlのジイソプロピルエーテルを添加してよく混合した後、遠心して、上清中のPHBH分解物のモノマーユニット組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所GC-17A、キャピラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1（カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4μm）を用いた。キャリアガスとしてHeを用い、カラム入口圧100kPaとし、サンプルは1μlを注入した。温度条件は、初発温度100から200℃まで8℃/分の速度で昇温、さらに200から290℃まで30℃/分の速度で昇温した。上記条件にて分析した結果、3HH比率が12%のPHBHであった。重量平均分子量は約66万、Tgは0℃であった。

[0064]（実施例1）

500mlペットボトルに製造例1で作製したPHBHの粉体（平均粒子径150μm）を約30gとサンゴを飼育している水槽（水量：400L）から採取した原水約400mLを入れた。この時点を培養開始とした。ペットボトルにフタをして、約5秒間強めにボトルを振って攪拌した。その後フタを閉めた状態で室温にて静置した。その後、1日に1回、約5秒間強めに

振って攪拌した。

培養液を元の水槽に戻す前に水槽中の水の硝酸塩濃度を上記の方法にて測定し、測定値から培養液（水浄化用液）を水槽に投入する量を設定した。硝酸塩濃度が 50 mg/L 以上の場合は水槽の水量 100 L に対し培養液を 10 mL 、 25 mg/L 以上 50 mg/L 未満の場合は 100 L に対し 4 mL 、 25 mg/L 未満の場合は 100 L に対し 1 mL とした。

最初の硝酸塩濃度測定は、培養開始から72時間後に行い、それを1日目とし、測定直後に培養液を戻した。その後は、2日目、3日目、4日目、7日目、10日目、11日目、12日目、13日目、20日目に培養液を投入した。26日目以降は水槽の水量 100 L に対し、培養液を 0.1 mL とし、5日間連続で投入し、2日間は投入を止める、というサイクルを継続した。硝酸塩濃度の経時測定結果を表1、2及び図3（a）に示す。

水槽（ $1500\text{ mm} \times 500\text{ mm} \times 600\text{ mm}$ ）は、水量 400 L で、水をオーバーフローにて循環させ、濾過材を用いないナチュラルシステムとした。

[0065]（実施例2）

ハタゴを飼育している水量 200 L の水槽（ $1100\text{ mm} \times 400\text{ mm} \times 450\text{ mm}$ ）を水環境として用いたこと以外は、実施例1と同様の方法で、培養と水槽への培養液（水浄化用液）の投入を行い、硝酸塩濃度を測定した。硝酸塩濃度の経時測定結果を表1、2及び図3（b）に示す。

[0066]（実施例3）

ハゼを飼育している水量 250 L の水槽（ $1200\text{ mm} \times 450\text{ mm} \times 450\text{ mm}$ ）を水環境として用い、濾過材システムを用いて水槽内の水を循環させたことを除き、実施例1と同様の方法で、培養と水槽への培養液（水浄化用液）の投入を行い、硝酸塩濃度を測定した。硝酸塩濃度の経時測定結果を表1、2及び図3（a）に示す。

[0067]（実施例4）

観賞魚を飼育している、1つの濾過材システムを介して6台が繋がった水

槽（各水槽の大きさは全て690mm×400mm×400mmとし、総水量は700Lとした。）を水環境として用いこと以外は、実施例1と同様の方法で、培養と水槽への培養液（水浄化用液）の投入を行い、各水槽の硝酸塩濃度を測定した。硝酸塩濃度（各水槽の測定値の平均値）の経時測定結果を表1、2及び図3（b）に示す。尚、6台の繋がった水槽の構成と濾過材システムについては、図2に準じたものである。

[0068]（実施例5）

観賞魚を飼育している、1つの濾過材システムを介して4台が繋がった水槽（各水槽の大きさは全て690mm×400mm×400mmとし、総水量は700Lとした。）を水環境として用いこと以外は、実施例1と同様の方法で、培養と水槽への培養液（水浄化用液）の投入を行い、各水槽の硝酸塩濃度を測定した。硝酸塩濃度（各水槽の測定値の平均値）の経時測定結果を表1、2及び図3（a）に示す。尚、4台の繋がった水槽の構成と濾過材システムについては、図2に準じたものである。

[0069]（比較例1）

培養液を水槽に投入しなかったことを除き、実施例3と同様にして、硝酸塩濃度を測定した。硝酸塩濃度の経時測定結果を図3（b）に示す。5日目以降は常に250mg/Lを超える高い値であった。尚、図では5日目以降は省略した。

[0070]（比較例2）

培養液を一度も攪拌しないこと以外は、実施例3と同様にして、培養と水槽への培養液（水浄化用液）の投入を行い、硝酸塩濃度を測定した。硝酸塩濃度の経時測定結果を図3（b）に示す。14日目以降は常に250mg/Lを超える高い値であった。尚、図では14日目以降は省略した。

[0071]

[表1]

表1 硝酸塩濃度(mg/L)の経時変化(1~14日目)

	試験期間(日目)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
実施例1	10	5	0	0	10	10	10	5	2.5	0	0	0	0	0
実施例2	50	50	50	50	50	50	50	50	25	10	10	5	0	5
実施例3	100	100	100	50	50	50	25	25	25	25	25	25	25	25
実施例4	50	50	10	10	20	20	10	10	5	0	5	5	10	0
実施例5	50	50	25	25	50	50	50	25	25	25	25	25	10	10
比較例1	100	100	100	100	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
比較例2	100	100	100	50	50	50	50	100	100	100	100	100	100	>250

[0072] [表2]

表2 硝酸塩濃度(mg/L)の経時変化(15~106日目)

	試験期間(日目)													
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	52	79	106
実施例1	0	0	0	0	0	0	10	10	5	2.5	0	0	0	0
実施例2	5	5	10	10	10	10	5	5	5	10	10	0	0	0
実施例3	20	20	20	20	10	10	20	20	20	10	10	5	0	0
実施例4	0	0	0	0	0	0	10	10	10	5	5	2	0	0
実施例5	10	10	10	10	10	10	25	25	10	5	0	0	0	0
比較例1	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250			
比較例2	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250			

[0073] 表1、2及び図3(a)、(b)に示す実施例1から5の結果から、硝酸塩濃度を低いレベルで制御できていることが分かる。

尚、培養液(水浄化用液)を水槽に投入した直後に、その水槽内での硝酸塩の濃度が増加する場合があったが(例えば図3(a)において、実施例5の20日目と21日目参照。)、一定期間経過後には低下した。この原因は明らかではないが、水環境中に存在する各種の微生物のバランスがより望ましいバランスに移行する過程で一時的に硝酸塩が増えたものと推測される。

[0074] (実施例6)

500mlペットボトルに製造例1で作製したPHBHの粉体約30gと、睡蓮を栽培している鉢(水量約100L)から採取した原水約400mlを入れた。この時点を経験開始とした。ペットボトルにフタをして、約5秒

間強めにボトルを振って攪拌した。この後、フタを閉めた状態で室温にて静置した。その後、１日に１回、約５秒程度強めに振って攪拌した。

培養開始から７日目に培養液１０ｍｌを鉢に戻した。培養液投入前はコケ等で濁っており底が見えない状態であったが、投入から１週間後には深さ約２０ｃｍの鉢の底が見えるようになった。鉢の底にはコケのようなものが凝集して球状となったものが見られた。理由は定かではないが、培養により得られた微生物が新たなコケ等の発生を抑制し、既に存在していたコケ等は時間と共に凝集したことが浄化に寄与したと考えられる。

[0075] (実施例 7)

５００ｍｌペットボトル１０本に製造例１で作製したＰＨＢＨの粉体約３０ｇずつと、福岡県福岡市にある睡蓮を栽培している人工池（水量約１５トン、ポンプによる強制循環式で、夜間の１６時間はポンプ停止）から採取した原水約４００ｍｌずつを入れた。この時点を培養開始とした。ペットボトルにフタをして、約５秒間強めにボトルを振って攪拌した。この後、フタを閉めた状態で室温にて静置した。その後、１日に１回、約５秒程度強めに振って攪拌した。

培養開始１０日目から１４日間、培養液約１００ｍｌを人工池に戻した。培養液投入前はコケ等で常に池が激しく濁っていたが、１４日間投入後はポンプ始動前には深さ約２０ｃｍの池の底が見えるようになった。池の底にはコケのようなものが凝集して球状となったものが見られた。

符号の説明

- [0076] １０、１０ａ～１０ｆ 水槽
１１、１１ａ～１１ｆ 原水
１１' 濾過原水
１２、１２ａ～１２ｆ 排水管
１３、１３ａ～１３ｆ 注水管
１４ 注水口
１５ 排水口

- 2 0 水槽用リアクター
- 2 1 培養槽
 - 2 1 a 傾斜面
 - 2 1 b 上壁面
- 2 2 取水管
- 2 3 取水口
- 2 4 培養液（水浄化用液）
- 2 5 P H A 粒子
- 2 6 攪拌羽
- 2 7 矢印
- 2 8 フィルター
- 2 9 排水部
 - 2 9 a 排水口
- 3 0 濾過材システム
 - 3 1 受水口
 - 3 2 濾過容器
 - 3 3 濾過空間
 - 3 4 濾過材
 - 3 5 空間
 - 3 6 排水口
 - 3 7 分離板
 - 3 8 小孔
- 4 0 ポンプ
 - 4 1 3 方コック

請求の範囲

- [請求項1] 嫌気性微生物を含む微生物群を含有する原水とポリヒドロキシアルカノエートからなる粒子とを含む培養液に対して、培養の開始後終了までの間に、外力を負荷して前記粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊してなる水浄化用液。
- [請求項2] 前記ポリヒドロキシアルカノエートが、ポリ（3-ヒドロキシブチレート- α -3-ヒドロキシヘキサノエート）である請求項1記載の水浄化用液。
- [請求項3] 前記外力が、攪拌及び／又は振動により負荷される請求項1又は2に記載の水浄化用液。
- [請求項4] 自然界または人工装置の水環境から採取した、嫌気性微生物を含む微生物群を含有する原水と、ポリヒドロキシアルカノエートからなる粒子と、を混合して培養を開始した後培養終了までの間に、外力を負荷して前記粒子表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊して得られた培養液の少なくとも一部を、前記原水を採取した前記水環境に投入する水浄化方法。
- [請求項5] 培養を開始後培養終了までの間に、前記外力を2回以上負荷する請求項4に記載の水浄化方法。
- [請求項6] 前記ポリヒドロキシアルカノエートが、ポリ（3-ヒドロキシブチレート- α -3-ヒドロキシヘキサノエート）である請求項4又は5に記載の水浄化方法。
- [請求項7] 前記人工装置の水環境が、水生生物を飼育している水槽内の水を含む水環境であり、前記培養液が投入された後の前記水槽内の水の硝酸塩濃度が0～50mg/Lである請求項4～6何れかに記載の水浄化方法。
- [請求項8] 水生生物を飼育している水槽内の水を取水し、この取水した水を用いて培養して得られる培養液の少なくとも一部を、前記水槽内に投入するための水槽用リアクターであって、

前記取水した水とポリヒドロキシアлкаノエートからなる粒子とを含む培養液が充填された培養槽と、

前記培養槽から前記水槽へと培養液を排出するための排出口と、

前記ポリヒドロキシアлкаノエートからなる粒子の表面に形成されたバイオフィルムの少なくとも一部を破壊するための外力を負荷する手段と、

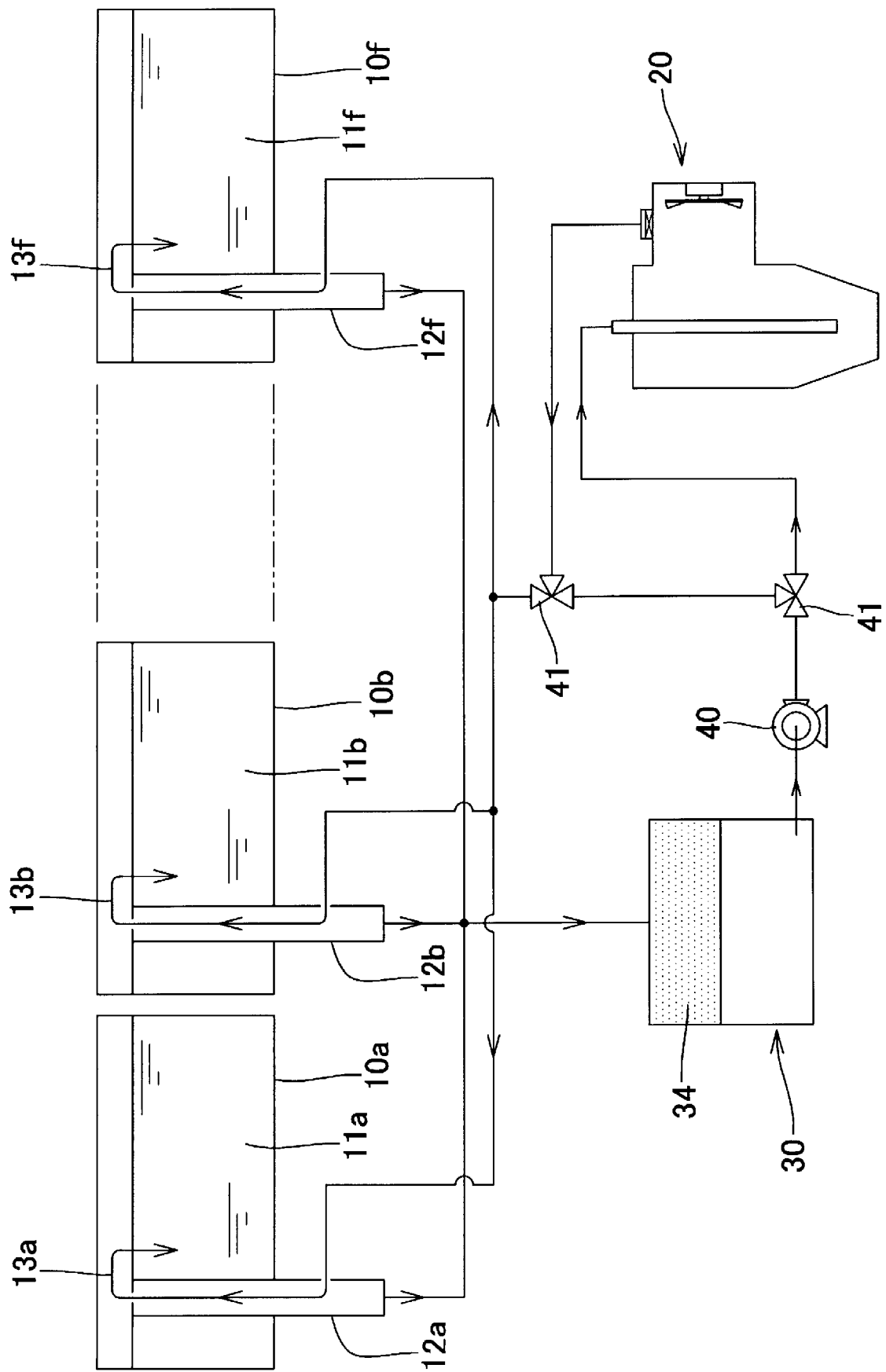
を備えた水槽用リアクター。

[請求項9] 前記ポリヒドロキシアлкаノエートが、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート）である請求項8記載の水槽用リアクター。

[請求項10] 前記排出口の近傍に、前記排出口が閉塞することを防止する手段をさらに備える請求項8又は9に記載の水槽用リアクター。

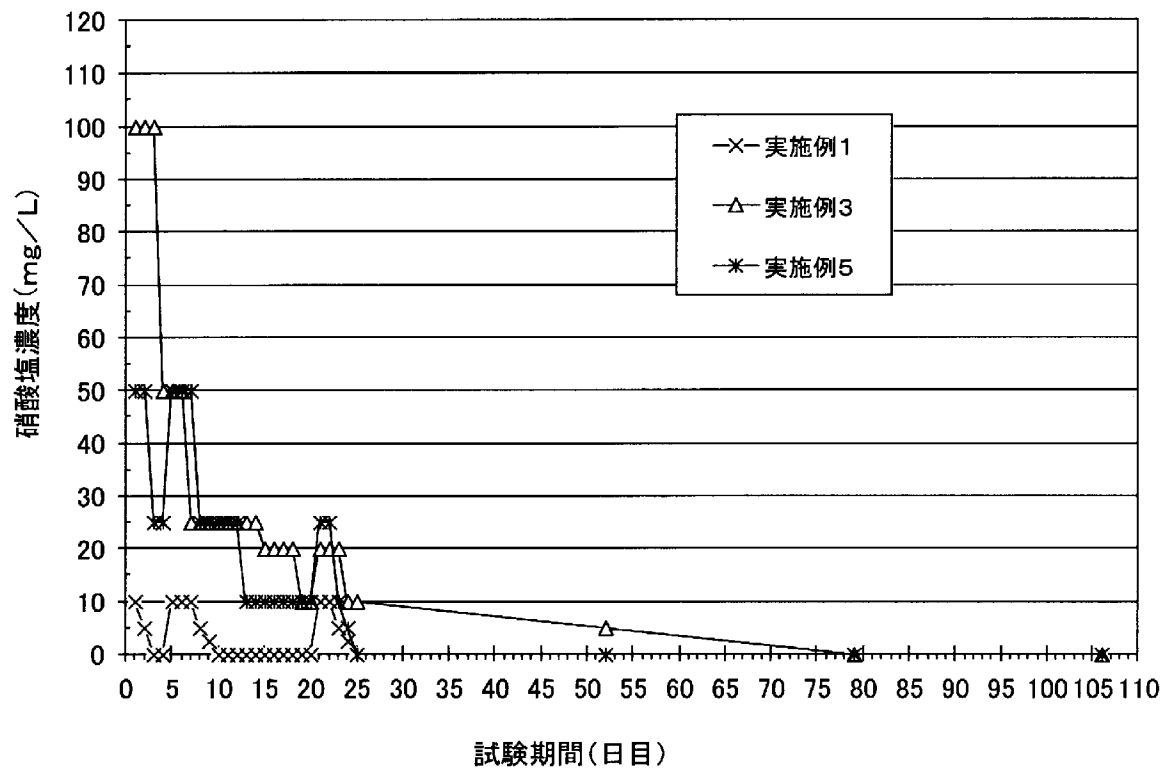
[請求項11] 請求項8～10の何れかに記載の水槽用リアクターを備えた水槽。

[図2]

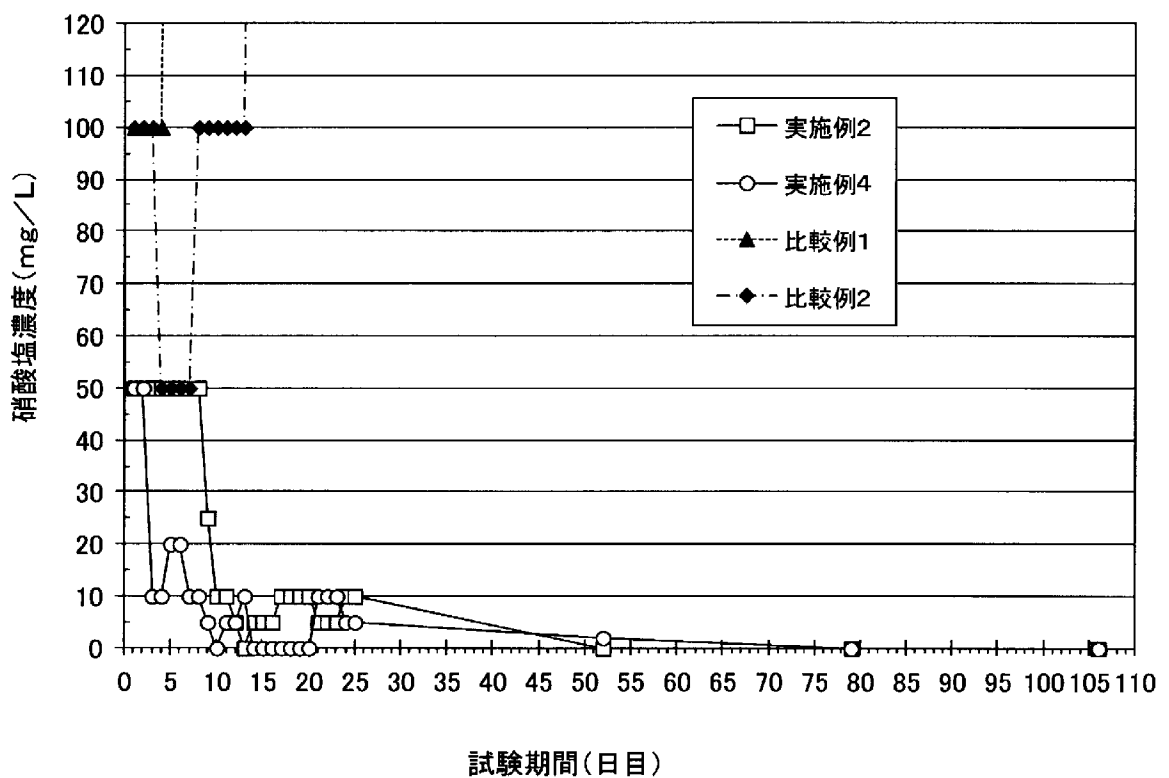


[図3]

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K63/04(2006.01)i, C02F3/00(2006.01)i, C02F3/28(2006.01)i, C02F3/34(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K63/04, C02F3/00, C02F3/28, C02F3/34, C12N1/21, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 4521384 B2 (Yugen Kaisha Murota Kogyosho), 11 August 2010 (11.08.2010), entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0019], [0047] (Family: none)	1-11
Y	JP 11-147097 A (Taisei Corp.), 02 June 1999 (02.06.1999), entire text; all drawings; particularly, paragraph [0010] (Family: none)	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 July, 2012 (10.07.12)

Date of mailing of the international search report
24 July, 2012 (24.07.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060256

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-56096 A (Chukoh Chemical Industries, Ltd.), 02 March 1999 (02.03.1999), entire text; particularly, paragraphs [0006] to [0008] (Family: none)	1-11
Y	JP 2011-58380 A (Tetra Japan & Spectrum Brands, Inc.), 24 March 2011 (24.03.2011), entire text; all drawings (Family: none)	8-11
Y	JP 2010-184177 A (Yanmar Co., Ltd.), 26 August 2010 (26.08.2010), entire text; all drawings (Family: none)	8-11
Y	JP 2008-283873 A (Hitachi Plant Technologies, Ltd.), 27 November 2008 (27.11.2008), entire text; all drawings (Family: none)	8-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01K63/04(2006.01)i, C02F3/00(2006.01)i, C02F3/28(2006.01)i, C02F3/34(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01K63/04, C02F3/00, C02F3/28, C02F3/34, C12N1/21, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 4521384 B2 (有限会社室田工業所) 2010.08.11, 全文, 全図, 特に【0019】、【0047】 (ファミリーなし)	1 - 1 1
Y	JP 11-147097 A (大成建設株式会社) 1999.06.02, 全文, 全図, 特に【0010】 (ファミリーなし)	1 - 1 1
Y	JP 11-56096 A (中興化成工業株式会社) 1999.03.02, 全文, 特に【0006】～【0008】 (ファミリーなし)	1 - 1 1

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 0 . 0 7 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 7 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2 B

9 3 1 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 3 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2011-58380 A (テトラジャパン株式会社) 2011.03.24, 全文, 全図 (ファミリーなし)	8-11
Y	JP 2010-184177 A (ヤンマー株式会社) 2010.08.26, 全文, 全図 (ファミリーなし)	8-11
Y	JP 2008-283873 A (株式会社日立プラントテクノロジー) 2008.11.27, 全文, 全図 (ファミリーなし)	8-11