

博士論文概要

論文題目

Development of nitrogen removal process using nitrifying granules and in situ detection of bacterial functional gene

硝化グラニュールを用いた窒素除去プロセスおよび細菌機能遺伝子の in situ 検出手法の開発

申請者

氏名

Tatsuhiko

Hoshino

星野

辰彦

専攻・研究指導
(課程内のみ)

応用化学専攻 化学工学研究

2004年11月

近年，湖沼や内湾等の閉鎖性水域の富栄養化が進行し赤潮やアオコ等の発生により，漁業への被害，景観の悪化，悪臭の発生等を引き起こし深刻な問題となっている。これらの問題を解決するためには，排水からの窒素除去が必要である。窒素除去には一般的に微生物による方法が用いられ，その反応は硝化反応と脱窒反応の二つの反応から構成される。この内，硝化反応は増殖速度の遅い硝化細菌が担っており窒素除去反応の律速段階となっている。したがって，生物学的窒素除去システムの高度効率化を図る上では，硝化細菌を反応槽内に高密度に保持することが必要不可欠である。細菌を反応槽内に高密度に保持する手段としては，細菌の自己凝集作用を利用してバイオフィームを作らせる方法が有用であるため，バイオフィーム内部の細菌群集構造が生物学的窒素除去プロセス等の環境浄化プロセスにおいて非常に重要な位置づけになっている。一方，近年，培養を伴わない分子生物学的な微生物生体解析手法が発展し，バイオフィーム内部の細菌群集構造解析を行なうことが可能になりつつある。

本論文では，硝化細菌を高密度に反応槽内に保持することにより窒素除去プロセスの高度効率化を行うと同時に反応槽内の硝化細菌の解析を行った。硝化細菌の高密度保持に関しては，微生物の持つ自己造粒作用に着目し，アンモニアを高濃度に含む無機性廃水中で硝化細菌が高密度に凝集した硝化グラニュールを作製した。さらに，このグラニュールを通常の活性汚泥法では不可能な高塩濃度産業廃水中の窒素除去に適用し，処理効率や安定性を検討した。また，このグラニュールを構成する微生物種およびグラニュール内部硝化細菌の空間的分布を把握するために，硝化を担う遺伝子をターゲットとした *in situ* PCR 法での検出系を確立した。

本論文は 6 章より構成されている。以下に各章の概要を述べる。

第 1 章では，バイオフィームを用いた窒素除去プロセスの効率化および分子生物学的手法による微生物生態解析の現状について，過去の研究動向を整理して本研究の研究背景をまとめ，意義および目的を述べた。

第 2 章では，硝化細菌が高密度に凝集したグラニュールを作成し，その特性について評価した。上向流好気性流動床 (AUFB) により 500 g/m^3 の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を含む無機性廃水を処理することにより硝化グラニュールの作製を試みた。その結果，運転開始後約 100 日目にはグラニュールが形成され始め，徐々にその大きさを増し，300 日目には直径 $350 \mu\text{m}$ 程度のグラニュールが得られた。また，電子顕微鏡でその表面を観察したところ，嫌気性のグラニュール表面によく観察されることが報告されている糸状性細菌は観察されず，生成した好気性硝化グラニュールが非常にユニークな構造をしていることがわかった。さらに，Denaturing gradient gel

electrophoresis (DGGE)法による解析の結果，*Nitrosomonas* 属のアンモニア酸化細菌が処理に大きく寄与していることがわかった。また，沈降性に関しても通常のバルク汚泥と比較すると非常に良いことがわかり，完全混合型反応槽を用いても流出することなく反応槽内に維持されることが示唆された。処理能に関しては，水理的滞留時間（HRT）を徐々に短縮することにより向上し，350日目には活性汚泥法のおよそ3倍にあたる $1.5 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ の窒素除去速度を達成した。運転期間400日間全体を通して，常に98%以上のアンモニア除去率を維持し，グラニュールを適用することによりアンモニア酸化細菌を高密度に反応槽内に保持することが可能となり高効率硝化が達成できることがわかった。

第3章では，硝化グラニュールを貴金属回収プロセスより実際に排出される高塩濃度産業廃水の窒素除去に適用し，硝化グラニュールの耐塩性を評価し，好気・嫌気連続処理システムを開発した。耐塩性の評価では好気槽による連続硝化実験を行った。グラニュールを段階的に高塩濃度条件にさらしていくことで，耐塩性のある硝化細菌がグラニュール内部に優占化し，塩濃度5%程度までは完全にアンモニアを除去できることがわかった。さらに，好気・嫌気連続処理実験に硝化グラニュールを適用した。150日の実験期間中，常にMLSSは $10,000 \text{ g/m}^3$ 付近に保たれておりグラニュールの反応槽内への保持能力の高さが証明された。また，入り口の全窒素濃度 $1000 \sim 1500 \text{ g/m}^3$ に対し出口濃度は常に 30 g/m^3 以下を示したことから，硝化グラニュールを用いた処理システムが高塩濃度産業実廃水中からの窒素除去に適していることが明らかとなった。

第4章では，硝化グラニュール内部の微生物生態解析，特に硝化反応の鍵を握るアンモニア酸化細菌の空間的分布を明らかにするべく，機能遺伝子をターゲットとした細菌の *in situ* 検出手法の開発を行った。機能遺伝子は細胞内に数コピーのみしか存在しないため感度増幅が必要であるが，本研究では細胞内でPCRを行うことにより標的遺伝子を増幅する *in situ* PCRの適用を試みた。標的遺伝子としてアンモニアをヒドロキシルアミンに酸化する酵素であるアンモニアモノオキシゲナーゼのアクティブサイトをコードする *amoA* を用いた。検出系としては *semi-nested* PCRで遺伝子の増幅を行い，2回目のPCRに用いたプライマーをジゴキシゲニン（DIG）で標識することにより増幅産物を標識した。細胞内に生じたDIG標識増幅産物はHNPP-Fast Red TRの検出系により検出した。まず，代表的なアンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas europaea* の純粋株について検討を行ったところ，*amoA* 遺伝子の *in situ* 検出に成功した。しかしながら，この検出系をグラニュール内のアンモニア酸化細菌に適用したところ，粒子状の非特異的なシグナルが多数発生し画像が非常に不鮮明になるといった問題が生じた。粒子状のシグナルの原因は，蛍光物質であるHNP-TRが細胞外に漏れ出したことであると思われたので，Alexa488標識抗DIG抗体によりDIG標識された増幅産物の検

出を試みた。その結果，非特異的シグナルが劇的に減少し，非常にクリアにグラニューール内部のアンモニア酸化細菌を検出することに成功した。この手法の確立により，これまで不可能であったバイオフィーム内部細菌の機能遺伝子に基づいた検出が可能となった。

第5章では，硝化グラニューールをアンモニア飢餓状態におき，*in situ* PCR法によりアンモニア酸化細菌の検出を試み，その感度を一般的に用いられているFluorescence *in situ* hybridization (FISH)法で検出した場合と比較した。上向流好気性流動床からサンプリングした硝化グラニューールを蒸留水中に懸濁し，アンモニア飢餓状態で振盪培養を行った。培養開始直後と2週間後のサンプルについて両手法でのアンモニア酸化細菌の検出を試みた。培養開始直後のサンプルにおいては，FISH法，*in situ* PCR法ともにアンモニア酸化細菌が硝化グラニューール表層部分に優占化している様子を検出することができた。一方，2週間後のサンプルにおいては *in situ* PCR法では実験開始直後と同様なシグナルが検出されたのに対し，FISH法ではシグナルを確認することができなかった。これは2週間アンモニア飢餓状態においたことにより，アンモニア酸化細菌の活性が低下し，細胞内の16S rRNA含量が低下したことに起因すると思われた。すなわち，FISH法では16S RNAを標的としているため2週間後のサンプルでは，シグナルが弱まり検出下限値以下になったと考えられた。一方，*in situ* PCRでは常に細胞内に数コピー存在する機能遺伝子を高感度に検出しているために，2週間後も変わらぬシグナルが得ることができた。これらの結果は，*in situ* PCR法によりバイオフィーム内部の細菌をその活性によらず検出することができることを示しており，バイオフィーム内部の細菌の機能や役割について解析する際にこの手法が非常に有用であることを示している。

第6章では，本論文の統括および展望を記述した。

以上，本論文では生物学的窒素除去プロセスの律速段階となっている硝化反応に焦点を絞りその高度効率化に関して検討を行った。特に，硝化細菌の集合体である硝化グラニューールの形成および高塩濃度産業廃水への適用を行い，高効率なシステムの開発に成功した。また，未知な部分が多いバイオフィーム内部の微生物群集構造，空間的分布，あるいは機能について解析することを可能とする新規手法の開発を行った。これらの研究成果は窒素除去プロセスの高度効率化のみならず環境浄化技術および微生物生態学，および環境微生物学の発展に多いに寄与することが期待される。

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○	<p>(1) (報文) <u>星野辰彦</u>, 広沢英信, 松川忠史, 小川知幸, 江尻慶央, 常田聡, 平田彰 硝化グラニュールを利用した高塩濃度産業廃水処理 <i>日本水処理生物学会誌</i>, (印刷中)</p> <p>○ (2) (報文) Satoshi Tsuneda, Tatsuo Nagano, <u>Tatsuhiko Hoshino</u>, Yoshihiro Ejiri, Naohiro Noda, Akira Hirata Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor <i>Water Research</i>, 37(20), 4965-4973(2003)</p> <p>○ (3) (報文) <u>Tatsuhiko Hoshino</u>, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, and Yuhei Inamori In situ PCR for visualizing distribution of a functional gene "amoA" in a biofilm regardless of activity <i>Journal of biotechnology</i>, 105(1-2), 33-40(2003)</p> <p>○ (4) (報文) <u>Tatsuhiko Hoshino</u>, Naohiro Noda, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, and Yuhei Inamori Direct detection by in situ PCR of the amoA gene in biofilm resulting from a nitrogen removal process <i>Applied and Environmental Microbiology</i>, 67(11), 5261-5266(2001)</p> <p>(5) (報文) <u>星野辰彦</u>, 寺原猛, 常田聡, 平田彰 T-RFLP 法による排水処理細菌叢の迅速モニタリング <i>用水と廃水</i>, 46(5), 408-412(2004)</p> <p>(6) (報文) Takeshi Terahara, <u>Tatsuhiko Hoshino</u>, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, and Yuhei Inamori Monitoring the microbial population dynamics at a start-up stage of wastewater treatment reactor by terminal restriction fragment length polymorphism analysis based on 16S rDNA and rRNA gene sequences <i>Journal of bioscience and bioengineering</i>(in press)</p>

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 (国際会議)	<p>(1) (国際会議) <u>Tatsuhiko Hoshino</u>, Takeshi Terahara, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata and Yuhei Inamori Monitoring complex bacterial communities using terminal restriction length polymorphism: application to wastewater treatment reactor <i>10th Internatinal Symposium on Microbial Ecology</i>, Cancun, 22-27, August, 2004</p> <p>(2) (国際会議) <u>Tatsuhiko Hoshino</u>, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, and Yuhei Inamori In situ detection of ammonia monooxygenase gene in a starved biofilm <i>103RD ASM General Meeting</i>, Washington, D. C., 18-22, May, 2003</p> <p>(3) (国際会議) <u>Tatsuhiko Hoshino</u>, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, and Yuhei Inamori In situ PCR for detection of ammonia monooxygenase gene in a biofilm <i>7th symposium on Bacterial Genetics and Ecology</i>, Bergen, 15-19, June, 2002</p> <p>(4) (国際会議) <u>Tatsuhiko Hoshino</u>, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, and Yuhei Inamori In situ PCR for visualizing of distribution of a functional gene "amoA" in biofilm regardless of its activity <i>Intenational Conference on Biofilm Monitoring</i>, Porto, 18-20, March, 2002</p> <p>(5) (国際会議) <u>Tatsuhiko Hoshino</u>, Naohiro Noda, Satoshi Tsuneda, Akira Hirara, and Yuhei Inamori Direct detection of ammonia monooxygenase gene in a biofilm by in situ PCR <i>9th International Symposium on Microbial Ecology</i>, Amsterdam, 26-31, August, 2001</p>
講演 (国内)	<p>(1) 星野辰彦, 寺原猛, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 T-RFLP 法による生物学的排水処理反応槽内のバイオコミュニティ変遷モニタリング <i>日本水環境学会年会第38回大会</i> 札幌 2004年3月</p> <p>(2) 星野辰彦, 寺原猛, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 T-RFLP 法による排水処理細菌叢の迅速モニタリング <i>日本水処理生物学会年会第40回大会</i> 熊本 2003年11月</p> <p>(3) 稲森悠平, 寺原猛, 星野辰彦, 平田彰 T-RFLP 法による排水処理微生物叢の簡易・迅速モニタリング技術の開発 <i>日本水環境学会年会第37回大会</i> 熊本 2003年3月</p> <p>(4) 星野辰彦, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 細胞内遺伝子増幅技術による機能遺伝子の高感度 in situ 検出 <i>化学工学会年会第68回大会</i> 東京 2003年3月</p>

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>(5) 星野辰彦, 寺原猛, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 T-RFLP 法を用いた機能遺伝子発現プロファイルの解析 日本水環境学会年会第37回大会 熊本 2003年3月</p> <p>(6) 星野辰彦, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 機能遺伝子をターゲットとしたバイオフィルム内細菌の in situ 検出法の開発とその問題点 学際シンポジウム「微生物生態解析と環境バイオテクノロジー」 東京 2003年1月</p> <p>(7) 星野辰彦, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 機能に基づいた排水処理微生物検出手法の開発 日本水処理生物学会年会第39回大会 大宮 2002年11月</p> <p>(8) 星野辰彦, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 in situ PCR 法による生物膜内アンモニア酸化細菌の機能遺伝子の検出 日本水環境学会年会第36回大会 岡山 2002年3月</p> <p>(9) 星野辰彦, 永野達生, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 硝化グラニュール形成微生物の分子生物学的手法による解析 第38回日本水処理生物学会 神戸 2001年11月</p> <p>(10) 星野辰彦, 永野達生, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 バイオフィルム内における機能遺伝子(amoA)の in situ 検出 日本微生物生態学会年会第17回大会 静岡 2001年11月</p> <p>(11) 星野辰彦, 永野達生, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 窒素除去の生物膜管理技術の高度化のための分子生物学的手法による硝化細菌群の認識技術 第4回日本水環境学会シンポジウム, 北九州, 2001年9月</p> <p>(12) 星野辰彦, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 無機性アンモニア含有排水処理プロセスにおけるアンモニア酸化細菌群の分子生物学解析 第35回日本水環境学会, 岐阜, 2001年3月</p> <p>(13) 星野辰彦, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平 分子生物学的手法による無機性排水処理プロセスにおけるアンモニア酸化細菌の評価・解析 第37回日本水処理生物学会, 神奈川, 2000年11月</p>