

博士論文概要

論文題目

Design of a material surface for rapid biofilm formation and application to a membrane-aerated biofilm reactor for simultaneous nitrification and denitrification

バイオフィルムの迅速形成を可能にする材料表面の設計と硝化脱窒逐次反応の膜曝気型バイオフィルムリアクターへの応用

申請者

Akihiko	Terada
寺田	昭彦

専攻・研究指導
(課程内のみ)

応用化学専攻 化学工学研究

2005 年 11 月

水の世紀と言われている今日において、富栄養化の誘発因子である窒素化合物を無害化できる排水処理プロセスの開発が健全な水環境を維持していく上で重要になってきている。窒素化合物は主に微生物の代謝機能により窒素ガスに変換されて無害化されるが、硝化・脱窒反応という操作条件の全く異なる 2 つの反応を介さなければならないため、2 つの反応槽が必要である。一方で、微生物が固体表面上に付着して形成する厚い微生物細胞の層（バイオフィルム）内はその厚さ方向で全く異なる環境・微生物群集が存在し、この現象を利用することで単一槽内での硝化・脱窒反応を起こすことが可能になる。単一槽型硝化・脱窒システムを構築できれば、装置の飛躍的なコンパクト化、低コスト運転が実現できるため、環境負荷低減の観点からその意義は非常に大きい。上記システム構築のためにはバイオフィルム内にて安定した酸化・還元反応場を創製することが必要であり、工学的課題として、迅速なバイオフィルム形成のために有利な材料表面の物理化学的性状の解明とその開発、バイオフィルム内への酸素供給の適切な制御が可能なバイオフィルムリアクターの開発の 2 点が挙げられる。

本論文では迅速なバイオフィルムの形成および強固なバイオフィルムの創製を目指すためには材料表面の物理化学的性状と微生物細胞の初期付着の関係が非常に重要であることを鑑みて、様々な物理化学的性状を有する材料表面を作製し、その物理化学的性状と微生物細胞の付着特性および活性の評価を行った。材料表面を修飾する手段として、ラフネス・表面電荷を精密に制御可能な放射線グラフト重合（RIGP）法に着目した。また、微生物細胞が材料表面へ初期付着した後のバイオフィルム形成を追跡し、その関係解析を行った。以上より、バイオフィルム形成に有利な材料表面を用いたバイオフィルムリアクターの開発に取り組んだ。バイオフィルム内の制限物質である酸素を効率的に供給し、単一槽内で硝化・脱窒反応を安定して起こすために多孔性中空糸膜を用い、その外側のバイオフィルムに内側から酸素を供給可能な膜曝気型バイオフィルムリアクター（MABR）を構築した。最後に MABR により逐次的に硝化・脱窒反応が起こせることを水質およびバイオフィルムの解析により実証した。

本論文は 7 章より構成されている。以下に各章の概要について述べる。

第 1 章では、微生物細胞の界面特性および付着現象の物理化学に関する既往研究、バイオフィルム形成制御・促進のための表面修飾法、およびバイオフィルムリアクターによる窒素除去に関する既往研究を概説し、本研究の目的と意義を明らかにした。

第 2 章では、ポリエチレン（PE）製の平膜に RIGP 法を用いてエポキシ基を有するグリシジルメタクリレート（GMA）をグラフト重合し、さらにジエチルアミン（DEA）、亜硫酸ナトリウム（SS）を反応させることで材料表面を修飾した。得られた膜をそれぞれ GMA 膜、DEA 膜、SS 膜と命名した。表面修飾した材料のラフネス・膜電位はグラフト重合率に比例し、RIGP 法が材料表面の物理化学的性

状を制御するのに有効な手法であることを証明した。微生物の材料表面への付着速度の評価として pH が中性付近でゼータ電位がマイナスであるグラム陰性細菌 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Paracoccus denitrificans* の 5 菌種を用いて付着試験を行ったところ、膜電位がプラスの DEA 膜に微生物は迅速に付着し、PE と比較して最大で約 30 倍の付着速度を得ることに成功した。さらに、材料の表面積あたりの微生物付着数を評価したところ、GMA 膜および SS 膜への付着促進は表面積の増加に起因すること、材料表面の膜電位が微生物細胞の付着速度を支配する主要な因子であることが明らかになった。

第 3 章では、材料表面の膜電位に着目して、微生物細胞の付着特性および活性に関する検討を行った。RIGP 法により PE 製の平膜に GMA をグラフト重合し、1 ~ 3 級アミンであるアンモニア (AM), エチルアミン (EA), DEA をそれぞれ反応させることで材料を作製した。得られた膜をそれぞれ AM 膜, EA 膜, DEA 膜と命名した。膜電位についてのキャラクタリゼーションを行った結果、EA 膜と DEA 膜の膜電位はそれぞれのアミノ基の密度に比例したが、AM 膜の膜電位はアミノ基の密度によらずほぼ一定であった。*E. coli* とそれぞれの材料表面への付着速度を評価したところ、付着速度は膜電位の増大により上昇すること、換言すれば静電的相互作用により微生物の付着が促進されることが統計的に示された。さらに、付着した *E. coli* の活性を核酸染色法によって評価した結果、静電的相互作用が大きくなるにつれ死菌の割合が増える傾向が得られ、特に膜電位が -8 mV 以上になると材料表面に付着している *E. coli* の生菌率が激減することが明らかになり、この閾値の前後で微生物細胞と材料表面の相互作用が大きく変化することを見出した。

第 4 章では、材料表面の膜電位の違いがバイオフィルムの初期成長過程にどのような影響を与えるのかを検討した。PE 膜, GMA 膜, DEA 膜および SS 膜をフローセル内に設置し、*E. coli* を投入した。その後、培養基質を連続的に流入させ一定流速下のもとで形成したバイオフィルムを核酸染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、DEA 膜には生菌と死菌が重なり合うように複雑な状態でバイオフィルムが形成されていることを確認した。一方で、PE 膜, GMA 膜および SS 膜の材料表面にはバイオフィルムの形成がほとんど確認されず、プラスに帯電している DEA 膜の材料表面と *E. coli* の細胞表面の静電的相互作用により強固なバイオフィルムが形成されることを明らかにした。以上の結果から、表面電荷がプラスに帯電した材料表面は、微生物細胞の初期付着促進のみならずバイオフィルムの形成促進に寄与している可能性が示された。

第 5 章では、ジエチルアミノ基を導入した中空糸膜の外表面に硝化細菌を固定化し、中空糸膜内側からの酸素供給量に対する硝化速度の評価を行った。ジエチルアミノ基を有する膜表面への硝化細菌の付着速度は PE のそれと比較し約 10 倍

高いことが明らかになった。また，中空系膜内側から酸素を供給してバイオフィルム形成過程を追跡したところ，PE にはバイオフィルムがほとんど形成されなかったのに対し，ジエチルアミノ基を導入した膜には 1 ヶ月で 30 μm のバイオフィルムが形成され，表面修飾によるバイオフィルム形成促進効果が明らかとなった。無機アンモニア排水を対象として MABR の酸素供給を制御して連続運転した結果，約 1 ヶ月間亜硝酸酸化を抑えアンモニア酸化のみを起こすことに成功した。また，そのときの酸素利用効率は 100% に到達し，効率的なアンモニア酸化を達成したことから，酸素供給を精密に制御することで亜硝酸を経由する硝化・脱窒システムの構築への可能性を示唆した。

第 6 章では高濃度窒素含有排水の単一槽内有機物・窒素同時除去システムの開発を目指し，MABR の有機物・窒素除去特性，およびバイオフィルムの酸素濃度分布，微生物生態分布を確認し，バイオフィルム内の挙動解析および窒素除去経路の考察を行った。約 1 年間の連続運転により表面積当たりの平均窒素除去速度 4.48 $\text{g-N}/(\text{m}^2 \cdot \text{day})$ を達成し，高効率な窒素除去性能を有することが示唆された。微小電極を用いて測定したバイオフィルム内の溶存酸素濃度分布を解析した結果，約 1500 μm の厚みを有するバイオフィルム内にて中空系膜の内側から供給された酸素が約 300-700 μm で完全に消費され，好気部位・無酸素部位の存在が確認された。また，Fluorescence *in situ* hybridization 法による微生物生態解析の結果より，好気部位にはアンモニアを亜硝酸に酸化するアンモニア酸化細菌が，無酸素部位には脱窒細菌を含むその他の細菌が存在していることを確認した。これらの事実から，異なる環境条件下で起こる硝化・脱窒という 2 つの反応を単一の MABR 内において起こせることを証明した。さらに，窒素除去経路の考察によりアンモニア酸化細菌は供給酸素の 86% を利用していることを確認した。この結果は硝酸を経由しないショートカットプロセスにて硝化・脱窒逐次反応が行われていた可能性を示唆するものであった。

第 7 章では，本論文の総括および展望を記述した。

以上，本研究では微生物付着およびバイオフィルム形成促進のために材料を表面修飾し，微生物細胞との相互作用および微生物活性の評価を行った。そして，バイオフィルム形成促進のための材料開発の設計指針を明らかにし，これを硝化・脱窒逐次反応が可能な膜曝気型バイオフィルムリアクターへの開発に結びつけた。これらの研究成果は窒素除去プロセスの効率化のみならず，環境技術開発およびバイオインターフェイス開発に大きく貢献できるものと期待される。

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>A. Terada</u>, T. Yamamoto, R. Igarashi, S. Tsuneda, A. Hirata Feasibility of a membrane-aerated biofilm reactor to achieve controllable nitrification <i>Biochemical Engineering Journal (in press)</i></p> <p>(2) (報 文) A. Bell, Y. Aoi, <u>A. Terada</u>, S. Tsuneda, A. Hirata Comparison of spatial organization in top-down- and membrane-aerated biofilms: A numerical study <i>Water Science and Technology</i> 52 (7), 173-180 (2005)</p> <p>○ (3) (報 文) <u>A. Terada</u>, A. Yuasa, S. Tsuneda, A. Hirata, A. Katakai, M. Tamada Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> 43 (2), 99-107 (2005)</p> <p>○ (4) (報 文) <u>A. Terada</u>, T. Yamamoto, K. Hibiya, S. Tsuneda, A. Hirata Enhancement of biofilm formation onto surface-modified hollow-fiber membranes and its application to membrane-aerated biofilm reactor <i>Water Science and Technology</i>, 49 (11-12), 263-268 (2004)</p> <p>(5) (報 文) <u>寺田昭彦</u> , 日比谷和明 , 常田聡 , 平田彰 メンブレンエアレーション法を応用した単一槽内有機物・窒素同時除去システム <i>用水と廃水</i> , 46 (2), 148-155 (2004)</p> <p>○ (6) (報 文) <u>A. Terada</u>, K. Hibiya, J. Nagai, S. Tsuneda, A. Hirata Nitrogen removal characteristics and biofilm analysis of a membrane-aerated biofilm reactor applicable to high-strength nitrogenous wastewater treatment <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i>, 95 (2), 170-178 (2003)</p> <p>(7) (報 文) K. Hibiya, <u>A. Terada</u>, S. Tsuneda, A. Hirata Simultaneous nitrification and denitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane-aerated biofilm reactor <i>Journal of Biotechnology</i>, 100 (1), 23-32 (2003)</p>
総説	<p>(1) <u>寺田昭彦</u> , 日比谷和明 , 常田聡 , 平田彰 中空系メンブレンを用いた新しい水処理技術 <i>水処理技術</i>, 44 (4), 153-164 (2003)</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) A. Bell, Y. Aoi, <u>A. Terada</u>, S. Tsuneda, A. Hirata Comparison of spatial organization in top-down- and membrane-aerated biofilms: A numerical study <i>IWA BIOFILMS 2004 Biofilm Structure and Activity</i>, Las Vegas, USA (October, 2004)</p> <p>(2) <u>A. Terada</u>, T. Yamamoto, R. Igarashi, S. Tsuneda, A. Hirata Feasibility study of a membrane-aerated biofilm reactor to achieve controllable nitrification under oxygen-depleted conditions <i>IWA 4th World Water Congress</i>, Marrakech, Morocco (September, 2004)</p> <p>(3) <u>A. Terada</u>, T. Yamamoto, K. Hibiya, S. Tsuneda, A. Hirata Enhancement of biofilm formation onto surface-modified hollow-fiber membranes and its application to membrane-aerated biofilm reactor <i>5th International Conference on Biofilm Systems</i>, Cape Town, South Africa (September, 2003)</p> <p>(4) <u>A. Terada</u>, R. Igarashi, S. Tsuneda, A. Hirata Development of a membrane-aerated biofilm reactor applicable to ammonia removal from industrial wastewater <i>The 2nd Joint China/Japan Chemical Engineering Symposium</i>, Shanghai, China (November, 2002)</p>
講演 (国内)	<p>(1) 松本 慎也, <u>寺田昭彦</u>, 青井 議輝, 常田 聡 メンブレンエアレーションバイオフィルムにおける実験的解明およびシミュレーションモデルの構築 日本微生物生態学会第 21 回大会, 福岡 (2005 年 10 月発表)</p> <p>(2) 松本 慎也, <u>寺田昭彦</u>, 青井 議輝, 常田 聡, 平田 彰 バイオフィルム内の微生物生態構造の実験的解明およびシミュレーション解析 化学工学会関東支部 50 周年記念大会, 東京 (2005 年 8 月発表)</p> <p>(3) <u>寺田昭彦</u>, 湯浅 敦, 常田 聡, 平田 彰 材料表面の物理化学的性質が微生物付着およびバイオフィルム形成に及ぼす影響の評価 化学工学会第 70 年会, 名古屋 (2005 年 3 月発表)</p> <p>(4) 松本 慎也, Bell Andrew, <u>寺田昭彦</u>, 青井 議輝, 常田 聡, 平田 彰 トップダウンおよびメンブレンエアレーションバイオフィルムにおける硝化細菌群の生態構造の比較 化学工学会第 70 年会, 名古屋 (2005 年 3 月発表)</p> <p>(5) <u>寺田昭彦</u>, 山本 哲也, 常田 聡, 平田 彰 メンブレンエアレーション型 SBR による窒素・リン同時除去 日本水環境学会第 39 回年会, 千葉 (2005 年 3 月発表)</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 (国内)	<p>(6) 湯浅敦，寺田昭彦，常田聡，平田彰 材料表面の物理化学的性質と微生物付着性および付着時の活性との関係 日本微生物生態学会第20回大会バイオフィルム研究部会，仙台（2004年11月）</p> <p>(7) 賀来周一，寺田昭彦，常田聡，平田彰 水素供与型メンブレン及び繊維状担体を用いた脱窒リアクターの開発 日本水処理生物学会第41回大会，つくば（2004年11月）</p> <p>(8) 湯浅敦，寺田昭彦，常田聡，平田彰 材料表面の物理化学的性質と微生物の付着性との関係解析 化学工学会秋田大会，秋田（2004年7月）</p> <p>(9) 寺田昭彦，山本哲也，常田聡，平田彰 メンブレンエアレーション法による低C/N比からの有機物・栄養塩同時除去 日本水環境学会第37回年会，熊本（2003年3月）</p> <p>(10) 寺田昭彦，永井潤，日比谷和明，常田聡，平田彰 メンブレンエアレーションリアクタの窒素除去特性と生物膜解析 化学工学会第67年会，福岡（2002年3月）</p> <p>(11) 永井潤，日比谷和明，寺田昭彦，常田聡，平田彰 生物膜内における基質・酸素浸透深さおよび微生物活性部位の流入負荷変動に対する応答性 化学工学会第66年会，広島（2001年4月）</p> <p>(12) 日比谷和明，永井潤，寺田昭彦，常田聡，平田彰 微小電極法を用いた生物膜内基質濃度分布の測定 化学工学会第33回秋季大会，浜松（2000年9月）</p>
その他	<p>(1) A. Terada, K. Hibiya, S. Tsuneda, A. Hirata Structure and activity of a biofilm in a membrane-aerated biofilm reactor applicable to simultaneous nitrification and denitrification <i>Biofilms in Industry, Medicine and Environmental Biotechnology</i>, Galway, Ireland (August, 2002)</p>
特許	<p>(1) 常田聡，平田彰，寺田昭彦 排水処理装置及び排水処理槽 特願 2004・274386</p>