

内 22-19

早稲田大学大学院理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

In situ identification and activities of nitrifying bacteria in
biofilm communities and its application to
wastewater treatment processes

生物膜における硝化細菌の微生物生態解析と
排水処理プロセスへの応用

申 請 者

青井

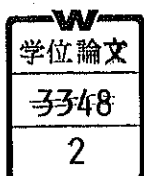
議輝

Yoshiteru

Aoi

応用化学専攻

化学工学研究



3448

2002 年 11 月

生物学的窒素除去は排水処理において最も重要なプロセスの一つであるが、一般的に律速段階である硝化反応は、それを担う硝化細菌の増殖速度が遅く、外的環境条件の変化に敏感であるため処理活性を安定に保つことが困難である。そのため生物膜を形成させて硝化細菌を系内に高密度に保持することは有効な手段の一つである。一方、生物学的排水処理プロセスは多種多様の微生物を自然に増殖させ対象排水にあった群集（複合微生物系）を構成させて、開放的に運転されている。ところが従来の環境バイオテクノロジーでは系内に存在する微生物を単なる活性のある汚泥（触媒）として見なし、生物の環境浄化機能そのものには深く立ち入れずに、ブラックボックスとして扱って研究開発を行ってきた。近年、分子生物学的な微生物生態解析技術の発展が著しい。これらの手法を用いることで、今まで全く触れることのできなかった複合微生物系の解析を行うことができるようになりつつあり、微生物の環境浄化機能の基礎的な解析に立脚して研究を進めることが今後重要になると考えられる。

本論文はこれらの手法を用いて硝化細菌の存在する生物膜を解析し、硝化細菌を中心とした生態学的知見を得て、新規プロセスの開発や処理性能の向上に応用させることを目的としている。具体的には、FISH法（Fluorescence *in situ* hybridization）を適用した生物膜内における硝化細菌の生態構造の解析、およびアンモニア酸化酵素をコードした遺伝子 *amoA* mRNA の定量解析によるアンモニア酸化活性のモニタリング手法の開発およびその有効性の評価を行った。一方、生態構造解析から得られた情報を活用して、従属栄養細菌を積極的に利用した硝化生物膜の新規創製法、および人工的な生物膜様構造体を作成して硫黄脱窒細菌と硝化細菌を共存させた硝化・脱窒同時進行型反応場の開発を行った。

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、分子生物学的手法の発展およびそれらを用いた微生物生態解析の現状について、特に生物膜に関する解析について重点的に過去の研究動向を整理して本論文の研究背景をまとめ、意義、目的を述べた。

第2章では、実際のリアクターで稼動している生物膜についてFISH法を用い、主にアンモニア酸化細菌をターゲットとして生態構造の解析を行った。また得られた生態構造に関する情報を元にして新規硝化生物膜創製法を開発した。2種類の運転条件の異なるリアクターをFISH法で解析した結果、アンモニア含有無機性廃水に適用した生物膜では独立栄養細菌の *Nitrosomonas europaea* を中心としたアンモニア酸化細菌が優占化していることが確認できたものの生物膜は薄く不安定であった。一方、高濃度の有機炭素および窒素成分を含む生活模擬排水処理リアクター中の生物膜の断面を観察すると、表層に従属栄養細菌が層を形成して優占化し、アンモニア酸

化細菌はその下層に存在していることが確認できた。次に上述した生活模擬排水中の生物膜を用い、生態構造をシフトさせることを検討し、通常は形成困難な完全無機性廃水における短期間での硝化生物膜形成手法の開発を行った。供給する基質の C/N 比を段階的に減少させて徐々に無機性の廃水にシフトさせ、同時に生物膜内の生態構造変化をモニタリングした。その結果、従属栄養細菌が減少しアンモニア酸化細菌が徐々に存在するエリアを外側に拡大して生物膜表層にも優占化したことが確認できた。生物膜はその物理的構造を確実に維持し、生物膜内にアンモニア酸化細菌が優占化していることが確認できたことから同手法を用いることで高密度硝化生物膜の新規創製法に応用できることが明らかになった。硝化速度も短期間で向上させることが可能であることが示された。

第3章では、第2章で述べた硝化生物膜を使用して生物膜内における硝化細菌群の生態構造およびその変遷について詳細に検討した。具体的には1) アンモニア酸化細菌の空間分布特性と活性変動、2) アンモニア負荷とアンモニア酸化細菌の優占種、3) 亜硝酸酸化細菌の優占種について解析した。処理特性の変動と生物膜内における硝化細菌の空間分布の変動について FISH 法と画像解析を組み合わせ、FISH 画像のデータを二次元化(数値化)、平均化することでより詳細に解析したところ、活性変動に応じて、空間分布特性も週レベルのタイムスケールでダイナミックに変動していることが確認された。また排水処理リアクターにおける流入アンモニア負荷とアンモニア酸化細菌の優占種との関係について解析したところ、アンモニア濃度のみならずアンモニア負荷がアンモニア酸化細菌の優占種の決定因子であることが判明した。アンモニア負荷が高い場合 *Nitrosomonas europaea* を中心とした種が優占化し、アンモニア負荷が低くなるとそれ以外のアンモニア酸化細菌が優占化する傾向があった。亜硝酸酸化細菌は *Nitrobacter* が優占種として生物膜の表面付近のみに低密度で存在することが判明した。近年、優占種の報告例の多い *Nitrospira* ではなく *Nitrospira* が優占化したのは本実験で用いた系が比較的高い窒素負荷であったことによると考えられた。

第4章では、機能遺伝子の発現解析によるアンモニア酸化活性の評価を行った。排水処理プロセスにおいて、リアクターなど系全体としての活性だけでなく、複合微生物系を構成する特定細菌の活性を特異的に把握することは操作条件の最適化を図る上で有効であると考えられる。そこで微生物群集解析に機能と活性というキーワードを持ち込むべく、汚濁物質分解にかかわる機能タンパク質の mRNA に着目した。mRNA の発現状態を測定することで特定細菌の活性を定量的に解析できると考えられる。本研究ではアンモニア酸化酵素 AMO の mRNA (*amoA* mRNA) の発現量を指標として排水処理プロセス中におけるアンモニア酸化細菌の活性を評価することの有効性を確認、

硝化阻害因子と活性変動との関係を mRNA の発現レベルで解析した。Competitive RT-PCR を用いて排水処理プロセスにおける転写制御因子について詳細な定量的解析を行ったところ、*amoA* mRNA の発現量を測定することでアンモニア酸化細菌の活性変動を mRNA 転写活性として追跡することに成功した。また DNA や rRNA を基準とした従来の解析手法に比べて mRNA のモニタリングでは極めて短時間の応答性（2 時間以内）で特定細菌の機能及び活性を同時に評価できることが判明した。さらに連続運転リアクター中でも mRNA の発現量変化を追跡できることが明らかになり、細菌の活性について mRNA の転写誘導および阻害因子に基づいた解析を行うことの意義および工学的応用への可能性が示唆された。

第 5 章では、好気単一条件下において硝化と脱窒が同時に進行する反応場の開発を行った。窒素除去は通常好気・嫌気の 2 段階のステップから成り立つため、複雑なプロセスが必要となる場合が多い。一方、一般的な硝化生物膜を FISH 法で観察した結果、硝化細菌が表層部にのみ密集して観察され、表面付近で溶存酸素が消費されていることが示唆された。したがって電子供与体を効率的に嫌氣的な雰囲気下の内部に供給することができれば硝化・脱窒を同時に進行させることができる。そこで人工的に生物膜様構造体を作成し、表層部で硝化を内部で硫黄脱窒を進行させて好気単一条件下において窒素除去が進行する反応場の作成を行った。スラグウールを支持体にして表層側に硝化細菌を、内部に硫黄脱窒細菌および粉末硫黄を固定して二層構造を有する厚さ 2~3 mm の生物膜様構造体を作成した。本構造体をアンモニア含有無機性排水に投入したところ好気単一条件下で硝化・脱窒が同時に進行し、表面積あたりの窒素除去速度として $0.59 \sim 1.04 \text{ g-N}/(\text{m}^2 \cdot \text{day})$ が得られた。本構造体は特定のリアクターを必要としないため、新規なプロセスを組まずに既存のリアクターに投入するだけで簡便に硝化・脱窒能をもたせることが可能となる。したがって、好気条件で本来硝化反応しか進行しない排水処理リアクターなどに本構造体を導入することにより、窒素除去能を付与することができるという全く新しいコンセプトを提案できる。

第 6 章では、本論文の総括および展望を記述した。

以上、本論文では排水処理プロセス、特に窒素除去プロセスに焦点を絞り、各種分子生物学的手法を用いて、生物膜内の硝化細菌を中心とした活性と存在に基づいた生態構造の解析を行った。また得られた知見を応用し、有用細菌の新規固定化技術や新規窒素除去システムの開発を行った。これらの研究成果は窒素除去プロセスの効率化のみならず微生物生態学および環境浄化技術の発展に大いに寄与するものと期待される。