

学 位 論 文 題 名

Development of Super High-Rate Anaerobic Ammonium Oxidizing (Anammox) Biofilm Reactors

(超高速型嫌気性アンモニア酸化 (Anammox))

バイオフィルムリアクターの開発)

学位論文内容の要旨

閉鎖性水域の富栄養化、地下水の硝酸塩汚染、窒素化合物による土壤汚染等の問題が顕在化していることから、排水中の窒素除去は必要不可欠である。従来の窒素除去プロセスは一般的に硝化・脱窒プロセスが用いられているが、このプロセスは硝化槽において硝化液循環及び酸素曝気、脱窒槽において外部有機炭素源が必要となり、さらに温室効果ガスが発生する等の問題を抱えている。よって、持続可能な循環型社会を構築するためには、低コスト及び省エネルギー、環境負荷低減の観点においてより優れた窒素除去プロセスを選択する必要がある。この問題を解決できる窒素除去法として、近年、嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 細菌を利用した Anammox プロセスが注目されている。Anammox 細菌は *Planctomycetals* 目に属する独立栄養性細菌で、無酸素条件下においてアンモニア性窒素 ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$) を電子供与体、亜硝酸性窒素 ($\text{NO}_2^- - \text{N}$) を電子受容体として直接窒素ガスへ変換する極めて特殊な代謝経路を持つ。この細菌を排水中の窒素除去に応用することにより、ランニングコストを大幅に削減できる新規の窒素処理プロセスの構築が可能となる。しかしながら、Anammox 細菌は増殖速度が極めて遅く (倍化時間約 11 日)、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とされている。Anammox 細菌は難培養性細菌であるため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ため、現在まで、わずかな研究グループのみが経験に基づく試行錯誤的な方法で集積培養に成功しているだけである。2002 年、デルフト工科大学の研究チームはロッテルダムの排水処理場において汚泥消化プラントの返流水を処理対象としたフルスケールの Anammox リアクター (72m^3) を建設し運転を開始したが、その立ち上げには 3 年以上を要するなど、未だ Anammox 細菌の効率的な集積培養法および最適運転条件は確立されていない。したがって、本学位論文では Anammox リアクターの効率的で迅速なスタートアップおよび高速型リアクターの開発を目的とした。さらに、立ち上げたリアクターの更なる処理性の向上及び安定化を目的として、分子生物学的手法を用いて Anammox 生物膜の群集構造解析及び微小電極をリアクターに直接挿入することにより、運転条件下における生物膜内の Anammox 活性を *insitu* で測定し、処理を担う細菌の菌体密度分布と活性分布の関係を明らかにすることを試みた。本論文は、6 章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第 1 章は、緒言であり、研究の背景と必要性および従来の窒素除去プロセスの問題点とその改善策である Anammox プロセスについてまとめている。

第2章では、これまでの研究によって開発された Anammox リアクターの処理性の比較、それぞれのリアクターから検出された Anammox 細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的な比較および Anammox 細菌の代謝システムに関する膨大な文献レビューを行っている。これまで、このような観点から網羅的にまとめられた文献レビューはなく、極めて貴重なものである。

第3章では、回分培養により、都市下水処理場汚泥から Anammox 細菌の集積培養を試みた。さらに、この集積系から得られた Anammox 細菌の 16S rRNA 遺伝子配列を基に、Anammox 細菌を特異的に検出するプライマーを新たに設計することにより、リアルタイム PCR 法を用いた Anammox 細菌の定量法の開発に成功した。これにより、Anammox 細菌を単離培養を介することなく、迅速かつ正確、簡便な定量が可能となり、本研究における回分培養系の Anammox 細菌が既往の報告にある Anammox 細菌の倍化時間 (約 11 日) よりも短い倍化時間 (3.6-5.4 日) である可能性があることが推定された。

第4章では、第3章で開発した定量的リアルタイム PCR 法を用い、様々な下水処理場汚泥 11 サンプルから Anammox 細菌数を定量した。さらに、各汚泥を用いた回分活性試験を行った結果、Anammox 細菌の菌体濃度が高く、流入原水中の全炭素/全窒素比が小さい汚泥が最も Anammox 細菌の集積培養に適していることが示唆された。この汚泥を不織布を充填した実験室規模の上向流ラム型リアクター (0.8L) に植種した結果、運転開始 50 日目に顕著な Anammox 反応が観察され、250 日目には窒素処理速度が世界最高速の $26 \text{ kg-N m}^{-3}\text{day}^{-1}$ を誇る Anammox リアクターの開発に成功した。現在まで報告されている Anammox 細菌を利用した実験室規模のリアクターの処理速度が $8.9 \text{ kg-N m}^{-3}\text{day}^{-1}$ であり、また現行の硝化脱窒プロセスの窒素除去速度が $0.05\text{-}4.0 \text{ kg-N m}^{-3}\text{day}^{-1}$ であることを考慮すると、本研究で開発した Anammox 反応リアクターは極めて処理効率に優れている。また、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った結果、本研究において集積培養された Anammox 細菌は既往の報告のある Anammox 細菌と 95% の相同性を持つ新種である可能性が示唆された。

第5章では、Anammox リアクターにおける *insitu* での生物膜内の Anammox 活性を測定と 16S rRNA 遺伝子に基づく FISH 法及び系統解析により生物膜内の細菌群集構造および空間分布を解析した。これまでに *insitu* で Anammox 反応を微小電極を用いて確認した研究例はなく、また微小電極は様々な分野で用いられるツールであるが、リアクター運転条件下で微小電極を直接挿入し、*insitu* で生物膜機構を解析した研究例は国内外を問わず存在しない。微小電極で測定された生物膜において、生物膜表面付近では硝化反応と Anammox 反応が生じ、深部では Anammox 反応が生じていないことが観察された。さらに、この結果は FISH 法により観察された生物膜内の細菌空間分布と符合し、リアクター運転条件下での Anammox 細菌の *insitu* 活性及び硝化細菌やその他の細菌との共存共生関係が本研究により初めて明らかとなった。また、リアクター各部における処理性に注目した場合、基質流入部では活発な Anammox 反応が確認されるのに対し、流出部付近では Anammox 細菌が優占的に存在しているにもかかわらず、Anammox 反応はほとんど生じていないことが明らかとなった。

第6章は、総括であり各章のまとめと今後の課題、展望について述べている。以上を要すると、本学位論文は培養が極めて困難な Anammox 細菌の効率的な培養法を確立し、Anammox リアクターの迅速なスタートアップおよび高速型リアクターの開発に成功した。さらに、各種分子生物学的手法を用い、これまで未知であったリアクター内生物膜の微生物群集構造および機能を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 岡 部 聡

副 査 教 授 渡 辺 義 公

副 査 教 授 船 水 尚 行

副 査 教 授 高 橋 正 宏

学 位 論 文 題 名

Development of Super High-Rate Anaerobic Ammonium Oxidizing (Anammox) Biofilm Reactors

(超高速型嫌気性アンモニア酸化 (Anammox))

バイオフィルムリアクターの開発)

閉鎖性水域の富栄養化、地下水の硝酸塩汚染、窒素化合物による土壤汚染等の問題が顕在化していることから、排水中の窒素除去は必要不可欠である。従来の窒素除去プロセスは一般的に硝化・脱窒プロセスが用いられているが、このプロセスは硝化槽において硝化液循環及び酸素曝気、脱窒槽において外部有機炭素源の添加が必要となる。さらに、温室効果ガスが発生する等の問題を抱えている。従って、持続可能な循環型社会を構築するためには、低コスト及び省エネルギー型で、かつ、環境への負荷が少ない窒素除去プロセスを選択・開発する必要がある。この問題を解決できる窒素除去法として、近年、嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 細菌を利用した Anammox プロセスが注目されている。Anammox 細菌は Planctomycetals 目に属する独立栄養性細菌で、無酸素条件下においてアンモニア性窒素 (NH_4^+-N) を電子供与体、亜硝酸性窒素 (NO_2^--N) を電子受容体として直接窒素ガスへ変換する極めて特殊な代謝経路を持つ。この細菌を排水中の窒素除去に応用することにより、ランニングコストを大幅に削減できる新規の窒素処理プロセスの構築が可能となる。しかしながら、Anammox 細菌は増殖速度が極めて遅く (倍化時間約 11 日)、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。現在まで、経験に基づく試行錯誤的な方法で集積培養に成功しているのみで、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。2002 年、デルフト工科大学の研究チームはロッテルダムの排水処理場において汚泥消化プラントの返流水を処理対象としたフルスケールの Anammox リアクター (72 m³) を建設し運転を開始したが、その立ち上げには 3 年以上を要するなど、未だ Anammox 細菌の効率的な集積培養法および最適運転条件は確立されていない。本学位論文では Anammox リアクターの効率的で迅速なスタートアップおよび高速型リアクターの開発を目的としている。さらに、立ち上げたリアクターの更なる処理性の向上及び安定化を目的として、分子生物学的手法を用いて Anammox 生物膜の群集構造解析及び微小電極をリアクターに直接挿入することにより、運転条件下における生物膜内の Anammox 活性を *in situ* で測定し、処理を担う細

菌の菌体密度分布と活性分布の関係を明らかにすることを試みている。

本論文は、6章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第1章は、緒言であり、研究の背景と必要性および従来の窒素除去プロセスの問題点とその改善策である Anammox プロセスについてまとめている。

第2章では、これまでの研究によって開発された Anammox リアクターの処理性の比較、それぞれのリアクターから検出された Anammox 細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的な比較および Anammox 細菌の代謝システムに関する膨大な文献レビューを行っている。これまで、このような観点から網羅的にまとめられた文献レビューはなく、極めて貴重なものである。

第3章では、回分培養により、都市下水処理場汚泥から Anammox 細菌の集積培養を試みている。さらに、この集積系から得られた Anammox 細菌の 16S rRNA 遺伝子配列を基に、Anammox 細菌を特異的に検出するプライマーを新たに設計することにより、リアルタイム PCR 法を用いた Anammox 細菌の定量法の開発に成功した。これにより、Anammox 細菌を単離培養を介することなく、迅速かつ正確、簡便な定量が可能となった。この手法を用いて、本研究で集積した Anammox 細菌の倍化時間は 3.6-5.4 日であり、既往の報告にある Anammox 細菌の倍化時間 (約 11 日) よりも短いことを示している。

第4章では、第3章で開発した定量的リアルタイム PCR 法を用い、様々な下水処理場汚泥 11 サンプルから Anammox 細菌数を定量している。さらに、各汚泥を用いた回分活性試験を行った結果、Anammox 細菌の菌体濃度が高く、流入原水中の全炭素/全窒素比が小さい汚泥が最も Anammox 細菌の集積培養に適していることを示唆している。その汚泥を不織布を充填した実験室規模の上向流カラム型リアクター (0.8L) に植種した結果、運転開始 50 日目に顕著な Anammox 反応を観察し、250 日目には窒素処理速度が世界最高速の 26 kg-Nm⁻³ day⁻¹ を誇る Anammox リアクターの開発に成功している。現在まで報告されている Anammox 細菌を利用した実験室規模のリアクターの処理速度が 8.9 kg-N m⁻³ day⁻¹ であり、また現行の硝化脱窒プロセスの窒素除去速度が 0.05-4.0 kg-N m⁻³ day⁻¹ であることを考慮すると、本研究で開発した Anammox 反応リアクターは極めて処理効率に優れていると言える。また、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った結果、本研究において集積培養された Anammox 細菌は既往の報告のある Anammox 細菌と 95% の相同性を持つ新種である可能性を指摘している。

第5章では、Anammox リアクターにおける in situ での生物膜内の Anammox 活性を測定と 16S rRNA 遺伝子に基づく FISH 法及び系統解析により生物膜内の細菌群集構造および空間分布を解析している。これまでに in situ で Anammox 反応を微小電極を用いて確認した研究例はなく、また微小電極は様々な分野で用いられるツールであるが、リアクター運転条件下で微小電極を直接挿入し、in situ で生物膜機構を解析した研究例は国内外を問わず存在しない。微小電極で測定された生物膜において、生物膜表面付近では硝化反応と Anammox 反応が生じ、深部では Anammox 反応が生じていないことを明らかにしている。さらに、この結果は FISH 法により観察された生物膜内の細菌空間分布と符合し、リアクター運転条件下での Anammox 細菌の in situ 活性及び硝化細菌やその他の細菌との共存共生関係が本研究により初めて明らかにされている。

第6章は、総括であり各章のまとめと今後の課題、展望について述べている。

以上を要するに著者は、培養が極めて困難な Anammox 細菌の効率的な培養法を確立し、Anammox リアクターの迅速なスタートアップおよび高速型リアクターの開発に成功した。さらに、各種分子生物学的手法を用い、これまで未知であった Anammox 細菌生物膜の微生物群集構造と in situ 活性の関係をマイクロスケールレベルで明らかにしたものであり、水環境工学および環境

微生物工学の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。