

学位論文題名

A microbiological study that is conducive to efficient ammonia removal processes

（アンモニア除去プロセスの効率化に資する微生物学的研究）

学位論文内容の要旨

農工業廃水や生活排水などの汚水中のアンモニアなどの窒素化合物やリンが十分に除去されないまま環境水中に流入した場合、河川湖沼あるいは沿岸部の富栄養化が起り、生態系の崩壊や飲料水の汚染を引き起こすことが危惧されている。また水質汚濁は、利用可能な水資源の減少にもつながり、世界的にも問題となっている。日本では、排水中の窒素化合物やリン、特定の有機物、および重金属などの濃度は水質汚濁防止法により厳密に規制されている。以上のことから、排水処理において窒素化合物を効率よく除去することは重要である。

現在、ほとんどの排水処理施設において、微生物のアンモニア代謝を利用した活性汚泥法が用いられている。これは、通常好気的なアンモニア酸化細菌群と亜硝酸酸化細菌群による硝化プロセスと、嫌気的条件下における脱窒細菌群による脱窒プロセスによって行われる。この2つのプロセスを経ることで、アンモニアは窒素ガスにまで変換され、大気中に放出される。また、これらの細菌群は、自然界における窒素循環にも重要な役割を果たすものである。

活性汚泥はこのように複雑な微生物群集から成り、これを用いて安定的かつ効率的な水処理方法を確立するためには、窒素除去にかかわる主要な細菌の生態・機能の理解が不可欠である。

本研究では、アンモニア処理プロセスの効率化を念頭に、嫌気的アンモニア酸化細菌に関する生化学的解析と新規耐熱性アンモニア酸化細菌の取得を行った。

まず、第一章では背景と本研究の意義について論じた。第二章では、従来の硝化と脱窒という2段階のプロセスにとって代わり得る、高効率な1段階プロセスとして期待される嫌気的アンモニア酸化（Anammox）に関わる細菌を生化学的に特徴付けた。

Anammox 細菌は、嫌気的条件下においてアンモニアを電子供与体、部分硝化により供給される亜硝酸を電子受容体として、直接窒素ガスまで変換する反応を行う。Anammox 細菌は細胞内に膜で仕切られた特殊な器官（anammoxosome）を持っており、ここでAnammox 反応が行われると考えられている。また、細胞同士が凝集したグラニュールを形成することで高いアンモニア代謝活性を発現すると同時に、沈降しやすくなることで、処理槽から流出しにくくなる。このことから、Anammox 細菌を活用するためには、ア

ンモニア代謝制御と共にグラニүүл形成に関する理解が重要であると考え、タンパク質の発現解析を行った。

高いアンモニア酸化活性をもつ *Candidatus 'Brocadia sinica'* のグラニүүлをガラスビーズを用いて完全に破碎し、超遠心分離操作により可溶性の細胞質タンパク質画分と不溶性の膜タンパク質画分を得た。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE) とエドマン分解法によるN 末端アミノ酸配列の決定から、膜画分に特異的に高発現する3つのタンパク質(P35, P45, P90) を検出した。これらは相同性検索により、Anammox 反応にかかわる重要な酵素と予測されているタンパク質であり、さらに、窒素代謝関連遺伝子 RNA polymerase サブユニットであるシグマ54に特異的な二成分制御因子の下流に連続してなっていることがわかった。また、Anammox 反応とグラニүүл形成は密接な関係があることから、これらのタンパク質がグラニүүл形成にも関与している可能性も示唆された。そこで、これらの遺伝子をそれぞれ大腸菌に導入した形質転換体を作り出し、細胞接着の指標としてバイオフィーム形成量の測定を行った。その結果、すべての形質転換体において、ベクターのみの場合に比べてバイオフィーム形成量が増加した。また、SDS-PAGE においても P35 と P45 を導入した大腸菌では、目的タンパク質が発現していることを確認した。これは *Candidatus 'B. sinica'* の膜タンパク質が大腸菌においても膜に局在し得ることを示唆する初めての成果である。

第三章では、火力発電所の高温排水処理槽から今回新たに単離した、耐熱性の *Nitrosomonas* 属細菌について報告する。

Nitrosomonas 属細菌は、好氣的アンモニア酸化プロセスの鍵微生物であると共に、Anammox 細菌グラニүүлの外側にも存在し、Anammox 反応に必要な部分硝化を担っているとも考えられている重要なアンモニア酸化細菌である。しかし、独立栄養性細菌で増殖速度が遅いことや、pH、水温、有機物負荷などの環境要因を受けやすいことなどから、アンモニア処理の律速となっている。従って、硝化槽活性汚泥内において硝化反応を担う細菌の優占種を同定し、その諸特性を明らかにすることは、効率的なアンモニア除去プロセスにとって非常に重要である。実際、火力発電所排水処理場では自治体排水処理場の活性汚泥を用いているが、排水の温度や成分が大きく異なるなどの原因で、アンモニア除去処理速度が不安定で非効率的であるという問題をかかえている。そこで、火力発電所排水に適応した耐熱性アンモニア酸化細菌を取得することを目的に実験を進めた。

火力発電所排水処理上の活性汚泥から、MA 培地を用いて細菌の集積培養を行った後、1% グランガムを加えたMA プレートに段階希釈して培養した。出現したコロニーをMA 培地で振とう培養し、培地中のアンモニア残存量と亜硝酸残存量、及び培養液濁度の測定を行い、再度、MA プレートに塗布してコロニーを形成させた。アンモニアの減少と亜硝酸の増加が見られたコロニーについて16S rRNA の解析を行い、相同性検索を行ったところ、*Nitrosomonas communis* Nm2^T と97.7% の相同性を示した。しかし、生育可能温度を調べたところ、*N. communis* Nm2^T は 37℃以上では生育できないのに対し、単離した *Nitrosomonas* sp. は 48℃でも生育可能であったこと、菌体サイズの違い、生育可能な炭酸濃度が異なることなどから、本菌について耐熱性を有する新種の *Nitrosomonas* 属細菌、*Nitrosomonas thermotolerans* sp. nov. を提案した。*N. thermotolerans* は、有機物が少ない一方で灰分を多く含む排水を比較的高温条件(37-45℃) で処理する、火力発電所の排水処理槽という非常に特殊な環境に適応していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 川 正 章

副 査 教 授 福 井 学

特任助教 三 輪 京 子

教 授 岡 部 聡 (大学院工学研究院)

学 位 論 文 題 名

A microbiological study that is conducive to efficient ammonia removal processes

(アンモニア除去プロセスの効率化に資する微生物学的研究)

農工業廃水や生活排水など汚水中のアンモニアやリンが十分に除去されないまま環境水中に流入した場合、河川湖沼あるいは沿岸部の富栄養化が起こり、生態系の崩壊や飲料水の汚染を引き起こすことが危惧されている。また水質汚濁は、利用可能な飲料水資源の減少にもつながり、人類の生存にもかかわる重大な問題となりつつある。すなわち、排水から窒素化合物を効率よく除去することは自然生態系の維持のみならず人類生存のためにも重要である。

現在、ほとんどの排水処理施設では、微生物のアンモニア代謝活性を利用した活性汚泥法が用いられている。これは、通常好氣的なアンモニア酸化細菌群と亜硝酸酸化細菌群による硝化プロセスと、嫌氣的条件下における脱窒細菌群による脱窒プロセスによって行われる。この2段階プロセスを経ることで、アンモニアは窒素ガスにまで変換され、大気中に放出される。また、近年になって嫌氣的条件下でアンモニアを酸化する（アナモックス）細菌が注目されている。以上これらの細菌群は、自然界における全地球レベルでの窒素循環にも重要な役割を果たすものである。

まず、第一章では背景と本研究の目的および意義について論じた。第二章では、従来の硝化と脱窒という二段階プロセスにとって代わり得る、高効率な一段階プロセスとして期待される嫌氣的アンモニア酸化 (Anammox) に関わる細菌を生化学的に特徴付けた。

Anammox 細菌は、嫌氣的条件下においてアンモニアを電子供与体、部分硝化により供給される亜硝酸を電子受容体として、直接窒素ガスまで変換する反応を行う。Anammox 細菌は細胞内に膜で仕切られた特殊な器官 (anammoxosome) を持っており、ここで Anammox 反応が行われると考えられている。また、細胞同士が凝集したグラニュールを形成することで高いアンモニア代謝活性を発現すると同時に、沈降しやすくなることで、処理槽から流出しにくくなる。以上のことから Anammox 細菌をさらに活用するためには、アンモニア代謝制御と共にグラニール形成に関する理解が重要であると考え、膜局在性タンパク質の発現解析を行った。

高いアンモニア酸化活性をもつ ‘*Candidatus Brocadia sinica*’ のグラニュールをガラスビーズで完全に破碎し、超遠心分離操作により可溶性の細胞質タンパク質画分と不溶性の膜タンパク質画分を得た。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法とエンドマン分解法によるN末端アミノ酸配列の決定から、膜画分に特異的に高発現する3つのタンパク質 (P35, P45, P90) を検出し、同定した。これらはアミノ酸配列の相同性検索により、Anammox 反応にかかわる重要な酵素と予測されている anamoxosomeタンパク質であること、さらに、その遺伝子群は窒素代謝関連遺伝子 RNA polymerase サブユニットであるシグマ54に特異的な二成分制御因子の下流に連続してならんでいることがわかった。そこで、これらの遺伝子をそれぞれ大腸菌に導入した形質転換体を作成し、遺伝子産物の膜への輸送の指標としてバイオフィーム形成量を調べた。その結果、すべての形質転換体において、ベクターのみの場合に比べてバイオフィーム形成量が増加した。これは ‘*Candidatus B. sinica*’ の膜タンパク質が大腸菌においても膜に輸送されることを間接的に示唆する初めての成果である。

さらに本論文では、喫緊の問題をかかえる排水処理現場への対策にも取り組んだ。火力発電所排水処理場では自治体下水処理場の活性汚泥を用いているが、両排水の温度や成分が大きく異なるなどの原因で、アンモニア除去処理速度が不安定で非効率的であるという問題をかかえている。そこで第三章では、火力発電所排水に適応した新規な耐熱性アンモニア酸化細菌の取得を目的に実験を進めた。

火力発電所排水処理槽の活性汚泥から、MA 培地を用いたアンモニア酸化細菌の集積培養後、1% ゲランガムを加えたMA プレートに段階希釈してアンモニアの減少と亜硝酸の増加を示すコロニーを取得した。この細菌について16S rRNA 遺伝子の解析を行い、相同性検索を行ったところ、*Nitrosomonas communis* Nm2 と97.7% の相同性を有する近縁種であることが示唆された。また、生育可能温度を調べたところ、*N. communis* Nm2 は 37℃以上では生育できないのに対し、単離した細菌 (JPCCT2と命名)は 48℃でも生育可能であったこと、細胞形態の違い、生育可能な炭酸濃度が異なることさらには DNA-DNA hybridization test などから、JPCCT2 について耐熱性を有する新種の *Nitrosomonas* 属細菌、*Nitrosomonas thermotolerans* sp. nov. を提案した。*N. thermotolerans* は、有機物が少ない一方で灰分を多く含む比較的高温 (37-42℃) な排水という特殊な環境によく適応しており、本菌数を増強することが、火力発電所排水処理槽の安定化および効率化に直結することが期待される。

以上、アンモニア除去プロセスにおいて利用されている活性汚泥は非常に複雑な微生物群から構成され、まだ個々の生理生態や機能は十分に理解されていない。ここで得られた数多くの研究成果は、より効率的なアンモニア処理技術の基盤開発を通して環境科学の発展に大いに貢献するものである。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、研究に対する申請者の誠実かつ熱心な取り組みの姿勢と、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士 (環境科学) の学位を受ける資格を有するものと判定した。