

論文の内容の要旨

論文題目：異なる電子受容体を用いた生物学的窒素・リン除去プロセスにおける処理特性および細菌群集に関する研究

氏名：庄司 仁

下水処理における生物学的窒素は、アンモニア性窒素を硝酸性窒素へと酸化する硝化反応と、硝酸性窒素を窒素ガスへと還元する脱窒反応から構成される。前者は独立栄養細菌である硝化細菌が、後者は従属栄養細菌である脱窒細菌が担っている。一方、生物学的リン除去は、従属栄養細菌であるポリリン酸蓄積細菌 (PAOs) が担っている。脱窒細菌と PAOs がともに従属栄養であるために、窒素除去 (脱窒) とリン除去は、炭素源としての有機物について競合関係にある。したがって、我が国のように窒素やリンに比べて有機物の少ない下水を処理する場合には、有機物の量が制限因子となって窒素・リン除去が十分に機能しない。

窒素・リン除去が構造的に抱える有機物不足という課題に対して、リン除去を担う PAOs と電子受容体との関係 (利用特性) が注目を集めている。当初、従属栄養細菌である PAOs が摂取した有機物を酸化分解する際には、電子受容体として酸素を使うものと考えられていた。しかし最近の研究から、PAOs が利用できる電子受容体には、硝酸や亜硝酸も含まれることが明らかになった。硝酸や亜硝酸を電子受容体としてリン除去を行うということは、摂取した有機物を脱窒とリン除去とに重複して利用することを意味する。このような能力を持つ細菌 (脱窒性 PAOs) を活用して、限られた有機物を効率よく利用した窒素・リン除去に関する研究が進められている。

本研究では、酸素、硝酸、亜硝酸という 3 種類の電子受容体を与えて、実下水を基質とする回分式リアクターで活性汚泥を馴致した。リアクターの運転条件としては、PAOs の集積を意図して、嫌気状態 (電子受容体の存在しない状態) で基質 (実下水) を与えて十分に反応させた後に、電子受容体を与えてさらに反応を進めた。電子受容体が酸素のときは曝気によって好気状態 (電子受容体として酸素が存在する状態) を設定して、硝酸や亜硝酸の時にはそれぞれの塩の水溶液を添加して無酸素条件 (電子受容体として硝酸か亜硝酸が存在する状態) を設定した。前者の運転方法を嫌気好気法、後者を嫌気無酸素法と呼び、両者を組み合わせた嫌気無酸素好気法などもある。

嫌気好気法でリアクターの運転を始めて、嫌気無酸素好気法、嫌気無酸素法と、電子受容体を酸素から硝酸へと置き換えてゆく過程では、PAOs の利用できる電子受容体にも変化が見られた。嫌気好気法では硝酸をほとんど利用できなかったが、嫌気無酸素好気法以降では硝酸の利用能力を獲得した。細菌群集に対応させた言い方をすれば、酸素だけを利用する好気性の PAOs が減少するのにもなって、脱窒性 PAOs が増加していることになる。

本研究では、リン摂取活性の測定結果からみて、硝酸の添加を始めた際（嫌気無酸素好気法にした時）に脱窒性 PAOs が増加し、酸素の供給をやめた際（嫌気無酸素法にした時）に好気性 PAOs が減少していた。

汚泥の持つリン除去・電子受容体の利用特性が変化したことが、単なる環境への順応の結果なのか、それとも細菌群集レベルでの入れ替わりがあったのかを確認するために、分子生物学的な群集解析を行った。採用した方法は PCR-DGGE-Sequencing 法で、細菌の遺伝子を抽出して、増幅（PCR 反応）した後、ゲル電気泳動で分離（DGGE 法）する。このとき、それぞれの遺伝子がゲル上にバンドを形成するので、その強度の変化から生物量の変化が推定できる。さらに、分離されたバンドの塩基配列を解析（Sequencing）することで、対応する細菌もしくはその近縁種に関する情報が得られる。

群集解析（DGGE）の結果として、硝酸の添加をきっかけに新しく出現したバンド（細菌）が多数観察された。これらは、電子受容体として硝酸を利用できる可能性が高く、またその一部には脱窒性 PAOs も含まれるはずである。塩基配列を解読したところ、紅色細菌（*Proteobacteria*）の β サブクラスに分類される *Aquaspirillum* に近縁な配列、同じく δ サブクラスに属する *Polyangium* に近縁な配列、同じく γ サブクラスの *Thiothrix* に近縁な配列などが見つかった。逆に酸素を好む傾向のあったバンド（細菌）としては、緑色非硫黄細菌に近縁なもの、*Actinobacteria* に分類されるものなどが検出された。PAOs に関する既存の研究では *Rhodocyclus* 近縁種（*Proteobacteria*/ β サブクラス）の報告例が多数を占めるが、電子受容体として硝酸を与えることにより、脱窒性 PAOs の候補を新たに提案することができた。

ここまで述べてきた解析は、すべての細菌が持っている遺伝子（リボソーム RNA をコードする rDNA）を標的としたものである。本研究では、脱窒能力を持つ細菌を特異的に検出・解析するために、脱窒酵素をコードする遺伝子を標的とする群集解析も行った。結果としては、rDNA にもとづく解析と同様に、電子受容体の変化にもなうバンドパターンの推移が観察された。それぞれの塩基配列を解析するという成果も得られたが、近縁種に関するデータベースが少ないために、rDNA のように具体的な名前を挙げて分類・整理することができなかった。逆に言うと、脱窒遺伝子による群集解析の現在における課題—データベースの必要性—が浮き彫りになった。

硝酸による嫌気無酸素法の後、亜硝酸による嫌気無酸素法の運転も行った。亜硝酸経由の硝化脱窒は低コストな窒素除去方法として注目を集めているが、リン除去まで考慮する場合には、亜硝酸の毒性が PAOs に与える悪影響が懸念されていた。最近になって、亜硝酸を一時的に与えてるならば、PAOs が電子受容体として利用できることが判明したが、亜硝酸を長期的に与えて PAOs を馴致したのは本研究が初めての試みである。

その結果、リアクターの処理能力としてはあまり高くなかったが、汚泥のリン含有率などの PAOs の指標から、亜硝酸でも PAOs が集積できることを確認した。この亜硝酸で馴致された汚泥の特性を詳しく検討したところ、亜硝酸だけでなく酸素も利用できること、

硝酸も利用できるが順応のために 1 時間ほど必要なことが分かった。さらに、それぞれの電子受容体を用いたリン摂取の効率を測定したところ、最も効率の良い酸素に対して、硝酸や亜硝酸は 6 割程度の値を示した。これまでも、硝酸を電子受容体とすると同じように効率の低下が見られるという報告は存在したが、PAOs を対象に、亜硝酸でも同程度の低下であることが確認されたことになる。これは、亜硝酸で馴致された汚泥に対しては、毒性の高さから予想される効率の低下がそれほどないということを意味する。したがって、亜硝酸経由の窒素除去と PAOs によるリン除去との組み合わせは、少なくとも PAOs の立場からは問題なく実現できることが分かった。

汚泥の細菌群集を見る視点として、種レベルの同定や定量を試みるマイクロなものだけでなく、脱窒細菌や PAOs といったマクロな枠組みでとらえる考え方もある。特に実際の処理特性を表現するためには、代謝の特徴に応じた細菌群集の分類が役に立つ。本研究では、有機物を嫌気状態で摂取できるか、脱窒能力を持っているか、という 2 つの基準から、細菌を 4 つのグループに分類して、それぞれの役割を定量的に評価することを試みた。各グループの特徴は次のようになる。①好気性 PAOs, 嫌気状態で有機物摂取可能, 脱窒能力なし。②脱窒性 PAOs, 嫌気状態で有機物摂取可能, 脱窒能力あり。③好気性従属栄養細菌, 嫌気状態で有機物摂取不可能, 脱窒能力なし。④脱窒細菌, 嫌気状態で有機物摂取不可能, 脱窒能力あり。

このような分類にもとづいて、それぞれのグループが利用している有機物の割合を算出する手法を提案した。有機物の組成や系内で起きている反応は、国際水協会の提唱する活性汚泥モデル (ASM) を利用しながらも、実用性を意識して、できるだけ簡潔なモデルに改変した。計算の結果として、電子受容体を酸素から硝酸に変えてゆくと、有機物を利用する主役が、①と③の細菌グループから②と④の細菌グループへと変わってゆくことが定量的に説明できた。さらに、嫌気的な有機物の摂取が多かったにもかかわらずリン除去が不調な原因として、PAOs 以外の嫌気的な有機物摂取を行う細菌の存在が示唆された。このような性質を持つ細菌 (GAOs と呼ばれる) の存在は既知であるが、その役割を有機物摂取量の観点から定量的に説明できたことは本研究の成果である。

以上のように、異なる電子受容体を用いた生物学的窒素・リン除去プロセスに対して、処理特性の検討や群集構造の解析を行った。その結果、脱窒性 PAOs や好気性 PAOs の候補となる細菌を遺伝子の塩基配列情報として確認したこと、亜硝酸による PAOs の馴致に成功してその特徴を明らかにしたこと、有機物の利用量の観点から細菌群集を定量的に評価する手法を確立したこと、といった成果が得られた。