

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710072

研究課題名（和文） アナモックス反応を短期間で既存の排水処理施設に導入可能な
スタートアップ技術の開発研究課題名（英文） Development of a rapid startup technology applicable to
autotrophic nitrogen removal

研究代表者

寺田昭彦（TERADA AKIHIKO）

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30434327

研究成果の概要（和文）：

アンモニア酸化細菌（AOB）とアナモックス細菌は増殖速度が遅く、スタートアップの短縮化が技術的課題である。そこで、これらを利用した排水処理プロセスのスタートアップ短縮を目指すため、これらの細菌が迅速に固定化される担体を作製した。ポリエチレン製不織布担体に放射線グラフト重合法を適用し、エポキシ基を有するグリシジルメタクリレート（GMA）をグラフトし、ジエチルアミン（DEA）溶液に浸漬させ、GMAのエポキシ基をジエチルアミノ基に転換した（DEA担体）。化学的に正電荷に改質されたDEA担体はAOBを1日以内に固定化でき、付着速度は元の担体の10000倍に達した。9日間の培養で得たAOBバイオフィームのアンモニア酸化速度は、元の担体の4.4倍に達した。一方、アナモックス細菌集積汚泥でもアナモックス細菌はDEA担体に迅速に固定化され、窒素除去速度は元の担体と比較して2.4倍に向上した。

一方、細菌群のコミュニケーション機構であるクオラムセンシング（QS）がバイオフィーム形成を制御しており、上述した細菌群はアシル化ホモセリンラクトン（AHL）をQSを伝達するシグナル化合物である可能性が近年報告されている。したがって、このAHLを分解可能なアシラーゼを固定化した不織布担体を作製し、バイオフィーム形成の重要因子の解明を目指した。アシラーゼをDEA担体に固定化したシート上に形成されるAOBのバイオフィームは凝集化せず分散する傾向が得られた。つまり、この担体ではバイオフィーム化の引き金になるAHLの分解が起こり、バイオフィーム形成が抑制される可能性が示された。一方、このような傾向はアナモックス細菌のバイオフィームには見られず、他のシグナル物質が異なる機構によるバイオフィーム化が起こる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria have slow growth rates due to their autotrophic nature, which is always an engineering challenge. In order to shorten the startup time of a process for completely autotrophic nitrogen removal, surface of a bacterial carrier was chemically modified to attract bacterial adhesion and biofilm formation. Since it has been reported that these bacterial biofilm formations are potentially mediated by quorum sensing (QS) mechanism as cell-cell communication, another objective of the study was to elucidate biofilm formation mechanisms of AOB and anammox bacteria. Radiation-induced graft polymerization (RIGP) was applied to chemically graft glycidyl methacrylate (GMA) on a non-woven sheet made of polyethylene. The epoxy-group of GMA was converted into diethylamine (DEA sheet) to form a positively-charged surface attractive to bacterial adhesion. The DEA sheet immobilized AOB rapidly, the rate of which was 10^4 -fold as high as a pristine non-woven sheet. After 9 day of AOB incubation, ammonia oxidation rate of DEA sheet was higher than that of the pristine sheet by a factor of 4.4. The DEA sheet enhanced immobilization of anammox bacterial sludge, resulting in 2.4 times higher anammox rate than that on a pristine non-woven sheet.

An enzyme-immobilized sheet was fabricated to interrupt cell-cell communication among bacterial cells, which is a trigger to form biofilm. Acylase I, capable of degrading

QS-mediated signaling compounds, i.e. *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs), was immobilized onto a DEA sheet. AOB biofilm on this sheet was less robust and rather more sparse than that on a pristine non-woven sheet. This suggests that AOB biofilm without cell-cell communication was suppressed on the sheet because of breaking down AHLs in the biofilm. On the other hand, this trend was not observed regarding anammox biofilm. Another mechanism was involved to form the biofilm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域（環境バイオテクノロジー）

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：環境技術、微生物、バイオフィーム、アナモックス、微生物付着

1. 研究開始当初の背景

排水中の窒素除去技術には生物学的処理が有効とされ、従来から硝化・脱窒反応が用いられている。この方法では、最初にアンモニアが *Nitrosomonas* 等のアンモニア酸化細菌 (AOB) により亜硝酸へ酸化、亜硝酸は *Nitrobacter*, *Nitrospira* 等の亜硝酸酸化細菌によって硝酸へと酸化される。この硝化反応により硝酸まで酸化された後、嫌気条件で種々の脱窒細菌の働きにより、硝酸は亜硝酸へ、亜硝酸は一酸化窒素へと還元する反応経路により、最終的に窒素として放出する。ここで、窒素除去の前段であるアンモニア酸化反応を担う AOB は倍加時間が 1~2 日と長く、排水処理に有効な活性を持つまで長期間の培養期間を要する。また、近年明らかになっている嫌気性アンモニア酸化 (アナモックス) を担う独立栄養性細菌であるアナモックス細菌の倍加時間は、約 11 日とさらに長い期間の培養期間を要する。

したがって、排水処理プロセスの早期立ち上げにはこれらの独立栄養細菌の効率的培養が必要不可欠となっている。そこで、窒素除去に関わる独立栄養細菌の効率的培養、すなわち微生物の厚い層であるバイオフィームの迅速な形成が必要であると考えられる。本研究では、微生物固定化担体を化学改変する技術に着目し、以下の 2 つの戦術を提案し、窒素除去に関わる独立栄養細菌の迅速・効率

的培養および生理活性向上因子の解明を目的として研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、以下の 2 つの目的を達成するために、放射線グラフト重合を用いた材料を作製した。

(1) 物理化学特性に着目したバイオフィーム促進化戦術

細菌は総じて pH 中性付近で負に帯電している。付着する担体表面への静電的相互作用に着目し、担体表面を正電荷に帯電させることで、窒素除去に関わる独立栄養細菌を迅速に材料表面に固定化させる。正に帯電した担体を用いれば窒素除去に関わる独立栄養細菌の初期付着量が増加し、迅速なバイオフィームの形成が期待できる。これより、排水中の窒素の除去性能の向上が期待できる。

(2) 生理学的特性に着目したバイオフィーム促進化戦術

多くの細菌は Quorum sensing (QS) 機構と呼ばれる細菌細胞間のコミュニケーションにより細菌密度を感知して、バイオフィーム形成に関わる遺伝子の発現を制御している。密度の感知はシグナル物質を介して行われ、多くのグラム陰性細菌は *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) を用いていると報告されている (Davies *et al.* (1998) *Science*, 280, 295-298)。AOB も AHL

を介して QS を制御している可能性があり、活性汚泥に人為的に AHL を投与するとアンモニア酸化活性が上昇すると報告されている (Kobayashi *et al.* (2009) *J. Environ. Biotechnol.*, 9, 109-111)。しかし、AHL が AOB のバイオフィーム構造や活性にどのように影響を及ぼすかは解明されていない。そこで、AHL を分解する酵素 (Acylase I) を担体に固定化し、常に窒素除去に関わる独立栄養細菌の QS を阻害できる環境を創製できれば、QS が窒素除去に関わる独立栄養細菌の活性およびバイオフィームに及ぼす影響を背理的に解明できると考えた。

3. 研究の方法

(1) 担体の作製

本研究では放射線グラフト重合法により正電荷帯電担体および QS 阻害担体を作製した (図 1)。ポリエチレン (PE) 製不織布を基材とし、200 kGy の電子線照射により C-H 共有結合を切断、生成したラジカルへ反応性の高いエポキシ基を有するグリシジルメタクリレート (GMA) を重合し、グラフト鎖を形成させた。さらに、ジエチルアミン (DEA) をグラフト鎖のエポキシ基と置換することで表面を正に帯電させた担体を作製した (DEA 担体)。また、DEA 担体を濃度 1 mg/mL の Acylase I 溶液に 5 時間、130 rpm の振盪で浸漬させ、さらに 0.04 wt% のトランスグルタミナーゼ (TG) 溶液に 2 時間浸漬させることにより、酵素をグラフト鎖内に架橋により固定化し、QS を阻害できる担体を作製した (Acylase 担体)。

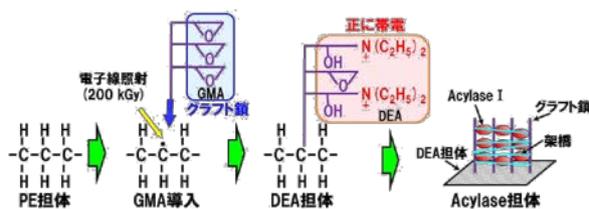


図 1 本研究で用いた担体の作製スキーム

作製した担体のキャラクタリゼーションとして、グラフト重合率、DEA のモル転化率および酵素固定化量を測定した。グラフト重合率はグラフト重合前後の基材の重量増加率から以下の式を用いて算出した。

$$\text{グラフト率 [\%]} = 100 \times \left(\frac{W_1 - W_0}{W_0} \right)$$

W_0 : 基材ポリエチレン製不織布重量 [g]

W_1 : グラフト重合後不織布重量 [g]

また、DEA のモル転化率は、GMA のエポキシ基が反応によりジエチルアミン基に置換

した量から定義されるものとし、DEA 転化前後の重量変化から以下の式を用いて算出した。

$$\text{モル転化率 [\%]} = 100 \times \frac{\left(\frac{W_2 - W_1}{M_{\text{DEA}}} \right)}{\left(\frac{W_1 - W_0}{M_{\text{GMA}}} \right)}$$

W_2 : 基材ポリエチレン製不織布重量 [g]

M_{DEA} : DEA の分子量 (73.14 g/mol)

M_{GMA} : GMA の分子量 (142 g/mol)

酵素固定化量は担体への浸漬前後の酵素溶液の濃度変化量から算出した。酵素濃度の測定は Bradford 法を用いた。酵素固定化量は次の式により算出した。

$$\text{酵素固定化量 [mg/g-carrier]} = \frac{v \times (C_0 - C_1 - C_2 - C_3)}{w}$$

w : 担体重量 [g]

v : 酵素溶液容積 [mL]

C_0 : 担体浸漬前酵素溶液濃度 [mg/mL]

C_1 : 担体浸漬後酵素溶液濃度 [mg/mL]

C_2 : 架橋後 TG 溶液濃度 [mg/mL]

C_3 : 保存用 NaCl 水溶液濃度 [mg/mL]

(2) AHL 分解活性試験

AHL の 1 種である *N*-hexanoyl-L-Homoserine lactone (C8-HSL) 水溶液に Acylase 担体を投入し、C8-HSL の分解能を測定した。C8-HSL の濃度の測定には、外因性 AHL の存在に反応して violacein を生産し、紫色に発色する菌株である AHL レポーター株 (*Chromobacterium violaceum* CV026 株) を用いた。シリコンキャップ付きの 100 ml 三角フラスコに 50 μmol/L の C8-HSL 水溶液 40 ml を注入し、担体無添加系、PE 担体系、Acylase 担体系により試験を行った。担体はそれぞれ 5 mm × 5 mm の立方体に裁断したものを 30 個投入した。各系は 30°C、130 rpm の振盪により反応させ、水溶液をサンプリングした。サンプリングは C8-HSL 水溶液に担体を投入した時を 0 h とし、0 h、10 h、60 h 経過時に水溶液を採取した。各サンプルは AHL レポーター株が植菌された培地に添加し、約 24 時間培養した。培養後の AHL レポーター株の紫色の確認により、C8-HSL の濃度変化を測定した。

(3) AOB による回分硝化試験

正電荷帯電担体および QS 阻害担体に AOB を固定化してそれぞれの挙動を検証した。PE 担体、DEA 担体 (モル転化密度 1.53 mol/kg、2.63 mol/kg)、Acylase 固定化担体、オートクレーブにより Acylase を失活させた Autoclave 担体の 5 系を用いた。各担体は 5 × 5 mm の立方体に裁断し、200 mL 三角フラス

コにそれぞれ 80 個ずつ投入した。各系へ窒素負荷量 200 mg-N/L の培地と混合した活性汚泥 (MLSS 800 mg/L, AOB 優占化率 80%以上) を投入し、温度 30°C, 振盪速度 130 rpm の条件下で 12 時間振盪培養した。振盪培養後は培地で 2 回洗浄することにより担体に付着しなかった浮遊物を除去した。各系は温度 30°C, 振盪速度 130 rpm の好気条件で培養し、1 日おきに回分的に培地を交換した。各系の担体は浮遊物除去の時点を開始点として経時的にサンプリングした (図 2)。



図 2 AOB による回分硝化試験

サンプリングした担体は DNA 抽出を行い、Real-time 定量 PCR により担体 1 個に付着した AOB 数を定量した。DNA 抽出は担体をホモジナイズした後に行った。また、アンモニア除去活性を測定するため、各系の培地を経時的にサンプリングし、無機態窒素濃度の経時変化を測定した。これにより各系の容積あたりのアンモニア除去活性を算出した。さらに、それぞれの担体に形成されたバイオフィルムを観察し、画像解析によりバイオフィルムの面積を画像解析により評価した。担体に付着した AOB のバイオフィルムを剥離させ、Live/Dead 試薬により蛍光染色したのちにバイオフィルムの構造を蛍光顕微鏡で観察した。バイオフィルム構造の観察は、画像解析ソフト Daime を用いて、10 視野以上の画像からバイオフィルムの面積、最大径および円周を測定し、平均値および標準偏差を算出した。

(4) アナモックス細菌の早期立ち上げへの試み

AOB を用いた回分付着試験と同様の実験を、アナモックス細菌を対象として行った。この実験は嫌気条件下で行うため、フラスコの代わりに密閉した 100 ml バイアル瓶を用いた。嫌気回分培養によりアナモックス反応を窒素消失量から計算して、各担体に形成されたバイオフィルムのアナモックス速度を比較した。

4. 研究成果

(1) 担体の作製

GMA を導入した不織布 (グラフト重合率 72.9%) を DEA 溶液に浸漬し、エポキシ基を DEA 基に転化させた。エポキシ基の DEA への置換した割合を示す転化率は、GMA 導入不織布の DEA への浸漬時間によって上昇し、一定

時間経過後に定常に至る傾向が得られた (データ示さず)。DEA への浸漬時間は約 6 時間で転化率は 90%以上の値で定常に達することが示された。したがって、本研究では GMA 導入後不織布の DEA 溶液への浸漬時間は 6 時間に統一して DEA 担体の作製を行った。

(2) AHL 分解活性試験

図 3 に AHL レポーター株による試験の結果を示す。

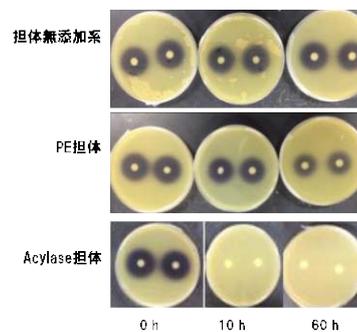


図 3 AHL レポーター株試験結果

この結果より担体無添加系および PE 担体系では紫色の発色が確認されたので、C8-HSL は分解されず水溶液濃度は一定であることが示された。Acylase 担体添加系では、試験開始時には紫色の発色が確認できたが、10 時間経過時点および 60 時間経過時点のサンプルでは紫色の発色が確認されず、C8-HSL の濃度は検出下限値以下であることが示された。したがって、Acylase 担体添加系では 10 時間経過時点で全ての C8-HSL が分解されていることが確認された。これより、Acylase 担体は QS においてシグナル物質として用いられる AHL を分解し、細菌の QS を遮断し得る担体としての機能が証明された。

(3) AOB による回分硝化試験

各系の担体 1 個に付着した AOB 数を定量した結果を図 4 に示す。

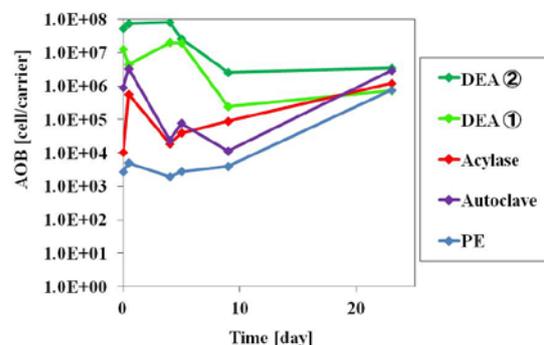


図 4 担体 1 個への AOB 付着量

結果より AOB の初期付着量 (12 時間) は DEA 担体②で最も高くなり、もとの不織布である PE 担体と比較して 10^4 オーダー高い値が

得られた。PE 表面に DEA を導入することで静電的相互作用を高め、AOB の担体への凝集効果を高められることを示した。培養日数が 20 日以上経過すると、全ての系で付着 AOB 数が $10^6 \sim 10^7$ オーダーの範囲内に収束し、定常に至った。PE 担体等の初期付着量が比較的小さな系に関しては、担体内で AOB が細胞分裂により増殖したためと考えられる。したがって、この実験の結果では、通常不織布の PE 担体は 20 日以上培養で増殖により $10^5 \sim 10^6$ cell/carrier の AOB 数に至るが、DEA 担体の場合は 1 日以内で $10^7 \sim 10^8$ cell/carrier の AOB を付着させることが可能であった。

各系の担体に活性汚泥を付着させてから 9 日後および 23 日後にアンモニア除去活性を測定した結果を図 5 および図 6 にそれぞれ示す。これより DEA 担体は PE 担体より高いアンモニア除去活性を有する傾向が得られ、9 日後の結果では PE 担体のアンモニア除去活性が 0.59 mg-N/L/h であるのに対し、DEA 担体②の活性は 4.4 倍の 2.57 mg-N/L/h に達した。また、9 日後の Acylase 担体は 0.73 mg-N/L/h であり、Autoclave 担体の活性が 2.70 mg-N/L/h であったのと比べて極めて低くなっていたため、AOB の QS を遮断したことによりアンモニア除去活性が低下した可能性が示唆された。回分試験開始後 23 日の結果では、各系で担体への付着 AOB 数が定常に至ったため、アンモニア除去活性に際立った特徴は見られなかったと考えられる。

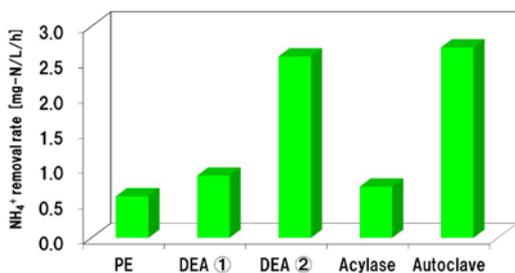


図 5 NH₄⁺除去速度 (回分試験 9 日後)

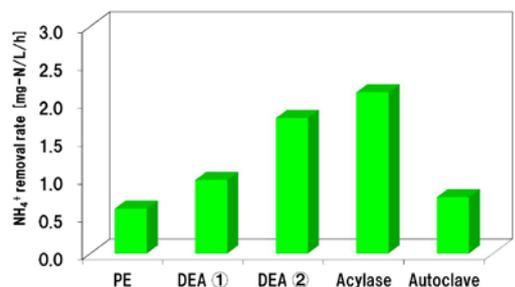


図 6 NH₄⁺除去速度 (回分試験 23 日後)

ここで、担体への付着 AOB 数の定量結果を用いて 1 細菌当りのアンモニア除去活性を算出した。9 日後および 23 日後の 1 細菌当りのア

ンモニア除去活性を図 7 および図 8 にそれぞれ示す。

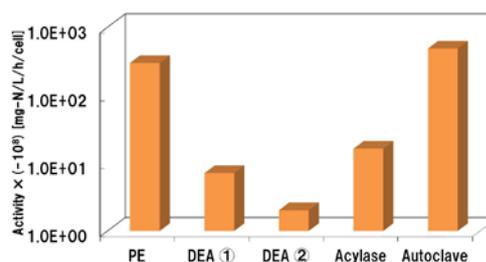


図 7 AOB1 細胞あたりの NH₄⁺除去速度 (回分試験 9 日後)

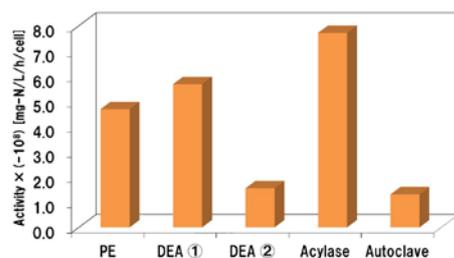


図 8 AOB1 細胞あたりの NH₄⁺除去速度 (回分試験 23 日後)

この結果より、DEA 担体②の細菌あたりの活性が最も低くなった。この原因として、AOB が凝集したことにより、酸素の担体内部への浸透が律速となり、嫌気域が生じて AOB への酸素供給量が不足したため、生菌率が低くなり、1 細菌あたりのアンモニア除去活性が低くなった可能性が考えられる。したがって AOB のアンモニア除去活性をさらに上昇させ、AOB 数を安定させるためには、酸素律速から解放するため、安定的な酸素供給を行うことが必要であると考えられる。

蛍光顕微鏡により培養 9 日後の PE 担体、DEA 担体②、Acylase 担体にそれぞれ形成されたバイオフィルムの構造を観察した。PE 担体、DEA 担体②、Acylase 担体に形成されたバイオフィルムを蛍光観察し、撮影した代表的なそれぞれの画像を図 9 に示す。この結果より、Acylase 担体では比較的小さなバイオフィルムが分散して形成されている傾向が見られた。そこで、それぞれの担体のバイオフィルムを 10 視野以上観察し、画像解析によりバイオフィルムの面積、最大径および円周の平均値および標準偏差を求めた。なお、最大径 1 μm 未満の蛍光発色物は細菌由来のものではないと考えられるので排除した。画像解析の結果、担体に形成したバイオフィルムの面積の平均値は PE 担体で $141 \pm 7.2 \mu\text{m}^2$ 、DEA 担体で $206 \pm 16.3 \mu\text{m}^2$ であったのに対し、Acylase 担体では $77.9 \pm 12.2 \mu\text{m}^2$ と比較的小さな値となり、QS の遮断によってバイオフィ

イルムの形成が阻害された可能性が示唆された。

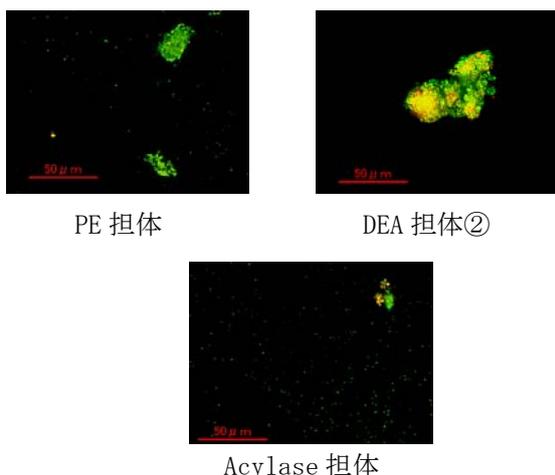


図9 各担体に形成されたバイオフィーム

Acylase 担体で他の系より小さなバイオフィームが形成されていることから、AOBはQSによりバイオフィームの形成を制御している可能性が考えられる。ゆえに、QSを遮断しているAcylase担体ではバイオフィームの形成が抑制され、バイオフィームが分散する傾向が得られたと考えられる。したがって、AOBが産出するAHL由来のQSによりバイオフィームの形成が抑制されていることが示唆された。

(4) アナモックス細菌の早期立ち上げへの試み

アナモックス細菌集積汚泥でもアナモックス細菌はDEA担体に迅速に固定化され、窒素除去速度は元のPE担体と比較して2.4倍に向上することが示された(データ示さず)。したがって、アナモックス細菌が集積化された汚泥においてもDEA担体は高い付着特性を示すことができた。一方、Acylase担体において、Autoclave担体と比較してアナモックス速度に有意な違いが見られなかった。AcylaseによるAHLを分解した担体においてもアナモックス速度およびバイオフィームの構造に大きな変化が見られなかった。したがって、他のシグナル物質か異なる機構によるアナモックス細菌のバイオフィーム化が起こる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) A. Terada, S. Zhou, M. Hosomi: Presence and detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and appraisal of anammox process for

high-strength nitrogenous wastewater treatment: A review, *Clean Technologies and Environmental Policy*, 査読有, 2011, 13: 759-781

DOI 10.1007/s10098-011-0355-3

[学会発表] (計5件)

(1) 寺田昭彦: 基盤表面改質によるバイオフィーム制御と環境バイオテクノロジーへの応用 化学工学会第78年会(受賞講演)(2013年3月19日 大阪大学 大阪)

(2) 樋口亮、細見正明、寺田昭彦: 不織布担体の化学改変によるアンモニア酸化細菌のバイオフィーム形成促進 化学工学会第78年会(2013年3月17日 大阪大学 大阪)

(3) 樋口亮、細見正明、寺田昭彦: 不織布担体の化学改変によるAOBのバイオフィーム形成促進 第64回日本生物工学会大会(2012年10月26日 神戸国際会議場 兵庫)

(4) A. Terada: Biofilm control in wastewater treatment by modification of bio-interfaces: Towards enhancement of biofilm reactor performance and prevention of biofouling The 28th Annual Meeting of the Japanese Society of Microbial Ecology (*invited*) (2012年9月19日 豊橋技術科学大学 愛知)

(5) 樋口亮、細見正明、寺田昭彦: 加工不織布担体を用いたアンモニア酸化細菌のバイオフィーム形成促進の試み バイオフィームと複合系研究会2011(2011年11月15日 早稲田大学 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 昭彦 (TERADA AKIHIKO)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 30434327