

～ 博士論文概要 ～

湖沼や内湾の富栄養化現象は，生活排水や産業廃水に含まれる窒素化合物が流入するために起こる．この問題を未然に防ぐためには，これらの排水中から窒素化合物を高効率に除去する必要がある．微生物による窒素除去は，低コストな排水処理技術として最もよく用いられている．しかしながら，硝化反応と脱窒反応という操作条件の全く異なる2つの反応を介さなければならないため，通常，複数の反応器が必要である．これに対して，小規模事業に導入可能な小型で維持管理の容易な単一槽型窒素除去システムの開発が強く望まれている．

本研究では，微生物が固体表面上に付着して形成する厚い細胞の層（生物膜と呼ばれる）に着目し，生物膜内の深さ方向の酸素濃度分布を制御することで単一槽内での窒素除去を実現できるシステムの開発に取り組んだ．開発を行う上で，生物膜内の酸素濃度分布や微生物生態分布を明らかにすることは重要であり，その手段として微小電極法および分子生物学的手法を活用した．微小電極は先端が非常に微小な針型センサであり，針の先端を生物膜に挿入することで生物膜内の特定の基質濃度分布を測定することができる．また，分子生物学的手法の一つである FISH（Fluorescence in situ hybridization）法を用いることで，培養操作を行うことなく生物膜内の微生物生態分布を観察できる．本研究では，これらの手法によって得られた生物膜内の物質移動および微生物生態学的知見を活かし，多孔質メンブレンの内側から酸素を供給するメンブレンエアレーション型バイオフィルムリアクタを考案した．そして，単一槽内で硝化反応と脱窒反応が逐次的に起こることを実証した，

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，微小電極や各種顕微鏡，分子生物学的手法による生物膜内の現象解明に関する既往研究を整理し，また，本研究の背景である生物膜を用いた排水処理研究の動向をまとめた．それにより，本論文の意義，目的を述べた．

第2章では，酸素，アンモニア，硝酸，pHをターゲットとした微小電極の作成およびそれらを用いた生物膜内の各基質濃度分布の測定を行った．測定はそれぞれ高濃度に窒素成分を含む無機模擬排水または有機模擬排水が流入する完全混合型流動槽内から生物膜を取り出し，各基質濃度分布を追跡した．また，得られた基質濃度分布から速度パラメータを算出し，微生物反応速度を概算した．微小電極法が生物膜内の特定の基質濃度分布を測定するのに適したツールであることが示された．

第3章では，微小電極を用いて測定した生物膜内の酸素濃度分布およびその結果を用いて算出した速度パラメータを基に，さまざまな生物膜厚み，生物膜密度およびバルク酸素濃度における生物膜内の酸素濃度分布をシミュレートした．シミュレーションは，微生物反応項として Monod 型を用い，有限要素法により非線形反応式を解くことで行った．その結果によると，生物膜厚みが増すことによって，生物膜の中心部（バルクから遠い部位）では酸素の少ない状態，もしくは無酸素状態の部

位が形成されることがわかった。また、これらの部位では、還元反応である脱窒反応が起きていることが水質測定からも推測された。これにより、生物膜厚みや酸素の供給速度を制御することによって生物膜内に局所的に異なった反応場を作ることが可能であり、異なった微小環境反応場を利用することで単一槽内、単一生物膜内において硝化・脱窒同時反応が可能であることがわかった。また、排水処理プロセスのさまざまな状況に応じて生物膜の厚み、密度および微生物生態系を制御する必要があり、それらの制御において酸素の供給速度が果たす役割は非常に大きいことが示された。

第4章では、流入排水の負荷変動時、特に濃度変動時における生物膜内酸素濃度の変化を追った。これにより、負荷変動時の排水処理における生物反応の特異現象の解明に努めた。負荷変動は急激に流入排水濃度を上げるステップアップ実験と濃度を下げるステップダウン実験を行った。その結果、生物膜内の酸素濃度分布はその瞬間のバルクの酸素濃度分布に大きく依存することがわかった。また、ほとんどの硝化細菌は生物膜内に存在し、その硝化反応速度は生物膜内の酸素濃度に大きく依存することがわかった。以上の結果から、生物膜内に適切に硝化細菌を保持し、生物膜へ酸素を十分に供給すれば硝化反応がスムーズに進行し、さらに生物膜内に酸素濃度の低い部位が存在すればそこで脱窒反応が逐次的に起こることが示唆された。一方、バルクの酸素濃度が低い状態、つまり生物膜へ酸素がほとんど供給されない状態では、硝化反応が起きず、硝化律速となるため窒素除去はできなくなることも同時に示された。

第5章では、多孔質担体の中空糸状メンブレンを支持体として用い、その外側に有用微生物（硝化細菌）を付着させ、内側から酸素を供給する“メンブレンエアレーション型バイオフィルムリアクタ (Membrane Aeration Biofilm Reactor; MABR)”を作製し、実験室規模での実証試験を行った。開発に当たり、まずメンブレンに効率よく硝化細菌を付着させる工夫を行った。一般に中性 pH 域では微生物細胞の表面がマイナスに帯電していることを踏まえ、本研究では、グラフト重合法によりメンブレン表面にジエチルアミノ基を導入してプラスに帯電させた。その結果、メンブレン表面上に硝化細菌を短時間で効率よく付着させることが可能になった。つぎに、グラフト重合処理を行った中空糸状メンブレンを用いて MABR を作製し、人工下水の処理試験を行った。その結果、排水流入開始 50 日後に 95% 以上の窒素除去率を達成し、単一槽での硝化・脱窒反応を実現した。また、この MABR では排水中の炭素成分も同時に除去でき、炭素・窒素同時除去を可能にした。それぞれの処理速度は炭素成分については  $0.42 \text{ kg-C}/(\text{m}^3 \cdot \text{day})$ 、窒素成分については  $0.16 \text{ kg-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{day})$  であった。さらに、運転中に得られた生物膜に対して微小電極を用いて生物膜内の深さ方向の pH、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$  濃度分布を測定したところ、 $\text{NH}_4^+$  は反応器下部から中部において除去されており、 $\text{NO}_3^-$  は反応器全体でほとんど確認されなかった。さらに、反応器内の生物膜および浮遊汚泥に対して FISH 法を適用し、アンモニア酸化細菌およびその他の真正細菌について生息場所を特定した結果、アンモニア酸化細菌は主に生物膜内に広く分布しており、その他の細菌（脱窒細菌を含む）は主に生物膜外の沈降汚泥や浮遊汚泥中に分布していることが判明した。

第6章では、本論文の総括および展望を記述した。

以上、本研究では窒素除去プロセスにおける生物膜内の物理現象や生態分布の解析を行った。特に、生物膜内の酸素濃度分布に注目し、さまざまな厚みをもつ生物膜に対して酸素濃度分布を測定し、シミュレーションを行った。また得られた知見を応用し、生物膜内での微小環境を制御することで単一槽内での硝化・脱窒同時反応を行うことができるメンブレンエアレーション型バイオフィルムリアクタを開発した。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反応工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。