HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ENRICHMENT, GROWTH KINETICS AND ECOPHYSIOLOGY OF ANAMMOX BACTERIA [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	張, 磊
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第13219号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69522
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Zhang_Lei_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士 (工学)　　氏名　張 磊

審査担当者　主　査　教　授　岡部 聡
副　査　特任教授　高橋 正宏
副　査　教　授　松藤 敏彦
副　査　准教授　佐藤 久

学位論文題名

ENRICHMENT, GROWTH KINETICS AND ECOPHYSIOLOGY OF ANAMMOX BACTERIA
(嫌気性アンモニア酸化細菌の集積培養法の確立および生理生態学的解析)

嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 細菌は、絶対無酸素条件下でアンモニア性窒素 (NH4+) を電子供与体、亜硝酸性窒素 (NO2-) を電子受容体として、直接窒素ガス (N2) に変換するユニークな機能を有している。Anammox 細菌は一般的な脱窒反応とともに、海洋からの重要な生物学的窒素除去プロセスの 1 つと考えられており、Anammox 細菌の寄与率の定量が試みられている。加えて、廃水処理分野においては、省エネ型高効率窒素除去プロセスとして期待されている。しかしながら、Anammox 細菌の増殖速度が比較的遅く集積培養系を確立することが非常に困難であるため、Anammox 細菌の生理生態およびニッチの分化に関する知見は極めて少ない。近年、Anammox 細菌の最大比増殖速度 (μmax) や半飽和定数 (Ks) が報告されているが、その測定方法や使用したバイオマスは研究間で異なり単純に比較することができない。さらに、多くの研究では、凝集したバイオマスを用いてこれらの動力学的定数が求められており、その信頼性にも疑問が残る。

そこで本博士論文では、これまで困難とされていた浮遊分散状態の Anammox 細菌のシンプルかつ迅速な高度集積培養法の確立を行っている。確立した集積培養法で培養したバイオマス (”Ca. Brocadia sinica”, ”Ca. Jettenia caeni”, ”Ca. Scalindua japonica”) を用いて動力学的定数 (μmax および Ks) を再評価している。さらに、得られた浮遊分散状態の高度集積培養系を用いて、NO2-制限環境下における細菌競合実験を行っている。これらの実験結果を基に、Anammox 細菌のニッチの分化機構に関して議論を行っている。

本論文は、7 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、Anammox 細菌の生理・生態学的重要性、および本論文の構成とその概要がまとめられている。

第 2 章では、これまでに報告された Anammox 細菌の集積培養系、動力学的定数の測定方法および使用されたバイオマスの種類との関係、Anammox 細菌のニッチ分化機構に関して文献レビューを行っている。

第 3 章では、浮遊分散状態の Anammox 細菌のシンプルかつ迅速な高度集積培養法を確立している。提案されている培養方法は、まず、”Ca. Brocadia sinica” のグラニュール状バイオマスを物理的に分散し、ポリビニールアルコール (6%,W/V)+ アルギンサンナトリウム (2%,W/V) の PVA-SA ゲルに包括固定し培養した後、この PVA-SA ゲルを物理的に分散し上清のみを膜分離型バイオリアクター (MBR) に植種し低窒素負荷で培養することにより、約 1 カ月で高度集積培養系を確立し

ている。これまでの報告例では少なくても数カ月を必要としており、本法の迅速性が伺える。

第 4 章では、第 3 章で得られた浮遊分散状態の高度集積バイオマス (”Ca. B. sinica” および”Ca. J. caeni”) を PVA-SA ゲルに包括固定し高窒素負荷で培養し、16S rRNA 遺伝子数の増加を qPCR により定量することにより μmax を求めている。qPCR 法は本章で新たに開発したものである。その結果、”Ca. B. sinica” および”Ca. J. caeni” の倍加時間はそれぞれ 0.33 d-1、0.18 d-1 となり、これまでに報告されている値よりも高かった。特に廃水処理への応用を考えた場合、”Ca. B. sinica” は有望な植種源となりうることを示唆するものである。

第 5 章では、これまで解明されていなニッチ分化機構の解明を目的に、”Ca. B. sinica” および”Ca. J. caeni” の制限基質 NO2-をめぐる競合実験を行っている。その結果、培養したリアクターの種類にかかわらず、低窒素負荷時は”Ca. J. caeni” が、高窒素負荷時は”Ca. B. sinica” が優占種となった。低窒素負荷時の”Ca. J. caeni” の優占化は、動力学的定数から予測される結果と一致せず、動力学的定数、特に Ks の信頼性が低く、再評価する必要性を示唆している。

第 6 章は、塩分が”Ca. B. sinica” と “Ca. Scalindua japonica” のニッチ分化に与える影響およびそのメカニズムについてまとめている。”Ca. B. sinica” はトリハロースを生産・蓄積することにより、また、“Ca. S. japonica” は K+ を細胞内に取り込むことにより浸透圧を調節し、高塩分濃度環境に適用していることを世界で初めて明らかにしている。トリハロースにより細胞内浸透圧を調整する”Ca. B. sinica” は、”Ca. S. japonica” に比べて 300 〜 400 倍多くのエネルギーを必要とするため、高塩分環境 (すなわち海水中) では優占種とはなり得ないことを示している。

第 7 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 細菌の迅速で効率的な高度集積培養方法を確立し、Anammox 細菌の生理・生態学的特性を明らかにしたものであり、水処理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。