

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26820225

研究課題名（和文）新規アナモックス細菌の探索およびN2O排出量削減型窒素除去リアクターの開発

研究課題名（英文）Exploratory novel anammox bacteria and development of a nitrous oxide saved nitrogen removal reactor

研究代表者

對馬 育夫 (Tsushima, Ikuo)

国立研究開発法人土木研究所・土木研究所（つくば中央研究所）・研究員（移行）

研究者番号：50462487

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：嫌気性アンモニア酸化（Anammox）プロセスは排水の生物学的窒素除去プロセスとして高いポテンシャルを持っている。近年、Anammoxプロセスの実用化が下水処理場や化学工場で増加している。しかしながら、微生物生態・生理学的には未解明な部分が多く残されている。本研究では、メタゲノム解析により、細菌叢が処理性に与える影響を調査した。その結果、前処理プロセスでは定常運転期と運転停止期において明確な差はないものの亜硝酸酸化プロセスおよびAnammoxプロセスでは明確な差が確認された。

研究成果の概要（英文）：The anaerobic ammonia-oxidizing (anammox) process has high potential as a biological nitrogen removal wastewater treatment process. In recent years, practical use of the anammox process has increased in wastewater treatment plants and chemical factories. However, there are many parts that still remain unknown in their microbial ecology and physiology. In this study, metagenomic analysis was conducted to understand the impact that operation conditions have on the bacterial community. In the pretreatment process, no difference in the microbial community was observed between the steady state and suspended conditions, whereas in the nitrification process and anammox process, the difference in the microbial community was confirmed.

研究分野：環境工学

キーワード：水処理 窒素除去

1. 研究開始当初の背景

従来、下・廃水中に含まれる窒素の除去には、硝化法と脱窒法を組み合わせたプロセスが主に用いられている。しかし、このプロセスは曝気や薬品にかかるランニングコストの観点から改善が求められている。さらに、処理過程において温室効果ガスである N_2O が発生するが、未だ明確な対応策は講じられていない。よって、持続可能な循環型社会形成のためには、低コスト及び省エネルギー、環境負荷低減の観点においてより優れた窒素除去プロセスを開発する必要がある。この問題を解決できる窒素除去法として、近年、嫌気性アンモニア酸化(Anammox)細菌を利用した Anammox プロセスが注目されている。Anammox 細菌は 1995 年オランダデルフト工科大学の研究グループによって初めてその存在が明らかになり、その後、回分集積培養や逐次型回分培養に成功し、前段で約半量のアンモニアを亜硝酸に変換させ、後段で Anammox 反応を行う Sharon-Anammox プロセスや一槽式で酸素供給量を制限しながら行う Canon プロセス等が提案されてきた。現在では実現化に向けたパイロットスケールでの研究がオランダを中心に行われている。また、国内では、2007 年、申請者が上向流型カラムリアクターを用い窒素除去速度が世界最速 ($26.0 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$) のベンチスケール型の Anammox リアクターの構築に成功し、Anammox の研究分野に大きく貢献した(通常の硝化脱窒プロセスの場合 ; $0.1\text{-}2.0 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ 、それ以前の Anammox リアクターの最大窒素除去速度 ; $8.9 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$)。また平成 24 年度から、国土交通省の「下水道革新的技術実証事業 (B-DASH プロジェクト)」において、熊本市・日本下水道事業団・株式会社共同研究体は、熊本市に処理能力 $50 \text{ m}^3/\text{日}$ の実証施設を建設し、窒素除去率が約 80% で運転を行っている。しかし、下廃水処理における新技術の実用化には環境負荷低減の観点が必要であるにも関わらず、国内外において Anammox プロセスにおける N_2O 発生量を評価した研究や N_2O 削減に向けた研究例はほとんどない。したがって、Anammox プロセスの実用化を推進するためには、詳細にプロセス全体からの N_2O 発生量の把握を行うとともに、 N_2O 排出量削減に向けた次世代型 Anammox リアクターの開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、下・廃水処理において高効率・省エネルギー型の新規窒素除去プロセスとして注目される嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) プロセスの実用化に向けた研究である。本研究では、次世代シーケンサーを用いて、これまで Anammox 細菌の存在が確認されていない環境にも焦点を当て、未知の Anammox 細菌やその他の新規有用細菌の探索を試みた。また、Anammox 細菌の集積培

養を通じて既往の報告のある Anammox 細菌の生理学的特性と比較した。さらに、地球温暖化抑制や閉鎖性水域の富栄養化抑制を目的とし、ガス態および溶解態 N_2O の排出量削減を考慮した N_2O 環境負荷低減 Anammox リアクター (ラボスケール) の開発を目指す。

3. 研究の方法

3.1

植種汚泥として、既往の Anammox プラント (熊本県東部浄化センター内に設置の Anammox 実証プラント : 研究協力者として (株)タクマ) に加え、下水処理場活性汚泥 (標準活性汚泥法、OD 法、高度処理 OD 法、MBR 法等)、し尿処理場活性汚泥、富栄養化型湖沼 (霞ヶ浦等)・内湾 (東京湾等) 底質、蓮田土壌、水田土壌、窒素飽和した溪流河川底質等を採用し、菌叢解析を行った。海水からは *Scalindua* 属の Anammox 細菌が検出されると考えられるが、淡水からの Anammox 細菌の集積に関する報告はほとんどなく、また、蓮田や水田土壌、渓流水については、これまでに報告がないため、未知の Anammox 細菌が検出される可能性がある。また、湖底質や蓮田土壌に関しては、これまでに細菌叢を調べた研究がほとんどないため、菌相解析そのものが貴重なデータという位置づけになる。これらの種汚泥を用い、Anammox 細菌の集積培養を行い、それぞれの窒素除去速度や生理学的特性を評価する。なお、Anammox 細菌の定量には、過去、申請者が設計した Anammox 細菌用プライマーを用い、Real-time PCR 法により行う。申請者は過去に全国の下水処理場約 70 箇所から Anammox 細菌の定量試験を行った経験があるが、高度処理 OD 法や MBR 法の下水処理場汚泥を対象にしていなかったため、本申請課題の結果が新たな指標になり、処理方法別の Anammox 細菌の存在比を評価する上での基礎的情報となり得る。

3.2

本研究では、上向流式反応槽 (内径 : 5.5 cm 、容量 0.8 L) を用い、生物担体として不織布を用い、Anammox プロセスの立ち上げを行った。基質は人工無機栄養塩培地を連続的に供給し定期的に Anammox 反応が確認でき、安定した処理性を保つことができたところで (通常 3-6 ヶ月)、系内の菌相解析を行い、Anammox 細菌やその他微生物コミュニティ形成細菌の同定を行った。また、試験期間中、研究協力者が管理する実規模 Anammox プラントが熊本地震に見舞われ、長期間、運転を停止せざるを得なかった。そのため、長期間運転を停止し、再び運転を開始し、処理性が安定するまでの期間、菌叢解析を行うことで、その因果関係を確認した。

3.3

DNA 抽出は、グラニュールを直接採取もしくは、処理水 2 L を $0.2 \mu\text{m}$ フィルターでろ過し、フィルター残留物を、Extrap Soil DNA Kit Plus

ver.2(日鉄住金環境)を用いて抽出した。抽出した DNA を鋳型として真正細菌の 16S rRNA 遺伝子領域を標的としたプライマー(S - D - Bact - 0341 - b - S - 17 および S - D - Bact - 0785 - a - A - 21)にオーバーハングアダプター配列を付加したのを用い、PCR 増幅を行った。PCR 反応条件は初期変性を 95°C で 3 分行った後、95°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒のサイクルを 25 サイクル行った。PCR 増幅産物は AMPure XP kit(Beckman Coulter Genomics)を用いて精製した。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3(600 サイクル、Illumina)を用いて解析した。解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU)-picking およびクラスター解析は QIIME を用い、97%以上の相同性を持つ配列を OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13_8 をリファレンスとした。

4. 研究成果

4.1 種汚泥の菌叢解析

次世代シーケンサーを用い、様々な環境から、Anammox 細菌の検出、同定を行った。実験に供した試料は、下水処理場活性汚泥(標準活性汚泥法、修正 Berdenpho 法、MBR 法、OD 法、高度 OD 法)、下水処理場メタン発酵槽消化汚泥、富栄養化型湖沼底質、ダム貯水池水塊、窒素飽和した溪流河川底質、畜産排水が畑を介して混入していると思われるアンモニア性窒素濃度が非常に高い河川底質、水田土壌、蓮田土壌等である。その結果、海洋性の Anammox 細菌として知られる *Candidatus Scalindua* が 0.06%-2.0% 検出された。最も多く検出されたのは、富栄養化湖底質で、次いで、窒素飽和溪流底質、アンモニア性窒素が非常に高い河川底質であった。

4.2

本研究における Anammox リアクターの処理性について、図 1 および図 2 に示す。運転開始 100 日目前後までは処理性が安定せず流出水のアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素、硝酸性窒素濃度が大きく増加したが、150 日目以降は平均アンモニア性窒素除去率が 0.65 kg-N/m³/day、平均亜硝酸性窒素除去率が 0.96 kg-N/m³/day と比較的良好に推移したが、処理性の向上は見られなかった。また、アンモニア性窒素除去速度：亜硝酸性窒素除去速度の比は、1 : 1.48 となっており、従来の報告のある Anammox 反応比である 1 : 1.32 を若干上回っており、一部、亜硝酸脱窒が優先して生じていることが推察される。

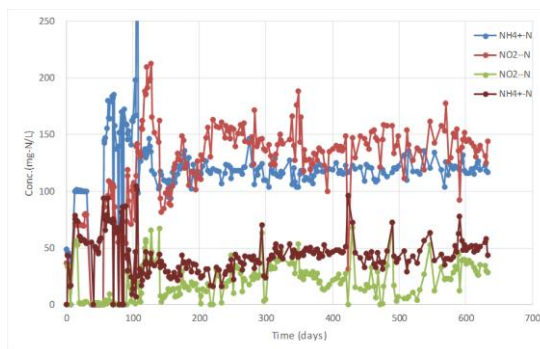


図 1 リアクターの処理性

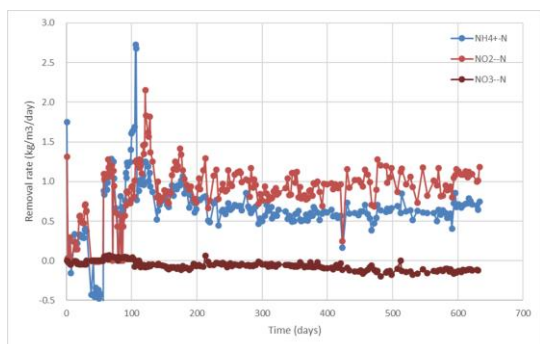


図 2 窒素除去速度

4.3

リアクター内の微生物群集構造を把握するため、リアクター内部に存在するグラニュールおよび流出水をサンプリングしたものから DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を対象にした系統解析を行った結果を図 3 に示す。その結果、リアクター 1 および 2 の流出水からは主に、Proteobacteria (①：図 3 の数字に対応) がそれぞれ 85.6% および 56.3% の割合で検出された。その内訳は、リアクター 1 では、Gamma proteo bacteria が 31.3%、Deltaproteobacteria が 8.0%、Betaproteobacteria が 43.7% だった。リアクター 2 では、Gamma proteo bacteria が 20.3%、Deltaproteobacteria が 3.6%、Betaproteobacteria が 27.6% だった。Gammaproteobacteria および Delta proteo bacteria は系内ではほとんど検出されないことから、種汚泥に存在していたものが系内では増殖するが、系内の HRT が短ければ系内に定着することができず、流出されるものと考えられる。また、同様に、流出水には、Bacteroidetes もグラニュールと比較して多く検出された (5.1%、4.8%)。グラニュールからは、Planctomycetes (②) が 33.6 (±4.0)%、Chloroflexi (④) が 17.5 (±7.0)%、Armatimonadetes (⑤) が 10.7 (±4.8)%、未分離培養門である OD1 (③) が 6.4 (±4.2)%、Actinobacteria (⑦) が 1.9 (±1.4)% 検出された。リアクター内部に存在するグラニュールには、色が濃紅色のものや茶褐色のものまで多々であった。その違いは主に、Chloroflexi および OD1 に含まれる細菌量によるものだと考えられた。

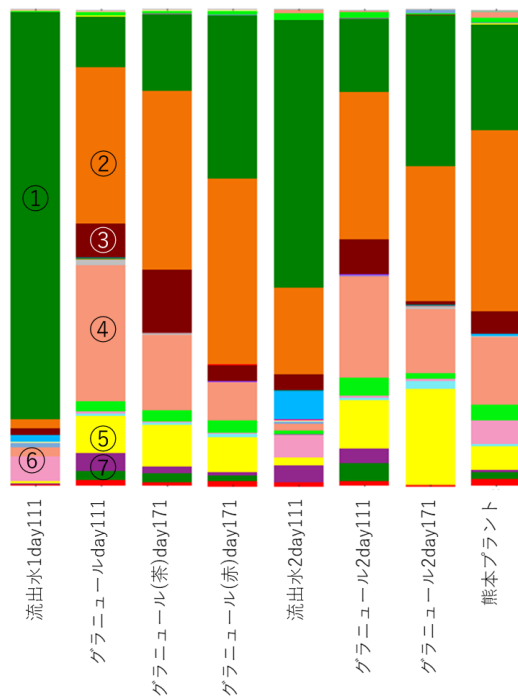


図3 リアクター内の微生物群集構成

4.4

ほとんどの下水処理場で N_2O 排出係数 160 mg/m^3 を下回っていた。ただし、標準法を行っている処理場やAO法を行っている処理場ではそれぞれ $847 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$ 、 $1,393 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$ と特異的に高い N_2O 排出係数を示した。各処理法における N_2O 排出係数と N_2O 転換率(窒素除去量あたりの系外に排出される N_2O 量)は、標準法において、それぞれ $6-184 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$ (算術平均: $92 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$)、 $0.0-6.7\%$ (算術平均: 0.877%)、AO法において、 $9-1,393 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$ ($233 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$)、 $0.0-2.5\%$ (0.516%)、窒素除去を行う処理法(MBR法を除く)、では $5-23 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$ ($9 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$)、 $0.0-0.4\%$ (0.092%)、MBR法では $5-14 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$ ($8 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$)、 $0.0-0.1\%$ (0.046%) と処理法により大きく異なり、さらに標準法の中でも、窒素除去率が高い処理場では比較的 N_2O 転換率が小さく、硝化が不十分な処理場では N_2O 転換率が高い傾向にあった。したがって、流入の NH_4-N 濃度が低くても、窒素除去率が低ければ、 N_2O 転換率は増大し、系外へ排出される N_2O 量はアンモニア負荷が高い処理場より多くなることが示された。

また、アナモックス法で試験運転を行っている処理場では、 N_2O 排出係数が約 $4,000 \text{ mg/m}^3$ と N_2O が極めて多く排出されていたが、流入 NH_4-N 濃度が 380 mg-N/m^3 と高濃度だったため、その結果、大量の N_2O が発生していた。 N_2O 転換率は 0.79% と標準法と比較してもやや高かった。Anammoxリアクターからの N_2O 発生状況の調査を行った。その結果、Anammoxリアクターからは、通常の

N_2O 排出量 ($160 \text{ mg-N}_2\text{O/m}^3$ -流入下水) を大きく上回る結果であった。リアクターから直接排出される N_2O 濃度は約 550 ppm だったが、担体を投入し培養を継続した結果、 450 ppm まで低下させることができた。

4.5

Anammox リアクターが長期間停止したときの微生物群集を図4に示す。

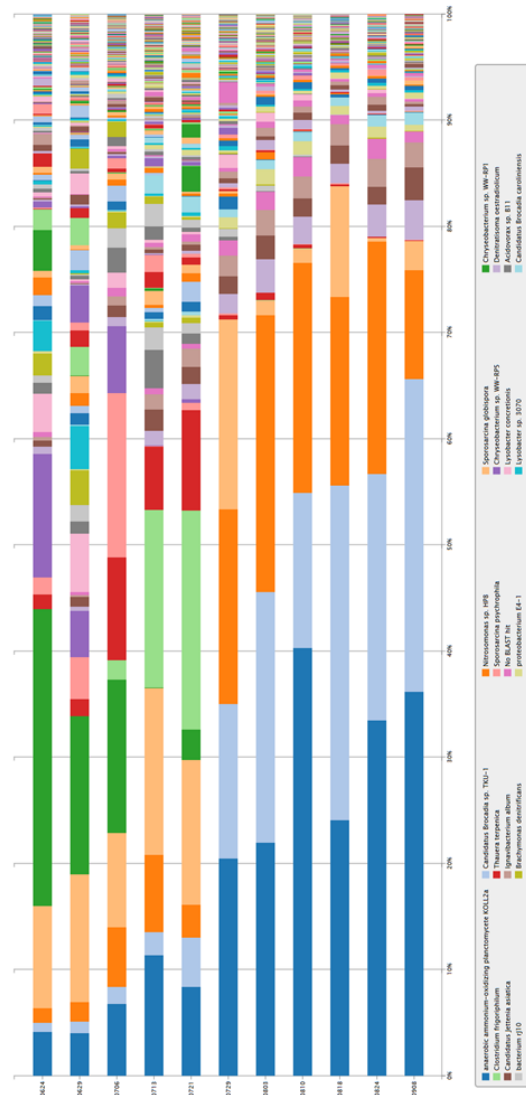


図4 リアクター停止後の微生物群集構成

リアクターは2016年4月に停止し、その2か月後から運転を再開した。再開時 Planctomycetes は 5.7% の検出率であったが、9月には 71.3% まで増加した。一方、Firmicutes および Bacteroidetes は当初 $40-50\%$ いたものが徐々に減少していった。効率的な Anammox リアクター構築のためには、Firmicutes や Bacteroidetes 等の細菌を排除することが重要であることが示唆された。また、7月に菌叢が大きく変化した。Chryseobacterium sp. WW-RP1 は6/24から7/6まで $14-28\%$ の割合

で検出されたが、7/13 以降はほとんど検出されなくなった。それに伴い、*Clostridium frigoriphilum* が 7/13 から 7/21 にかけて 16-20%の割合で検出された。また、*Thauera terperica* が 7/6 から 7/21 まで 6-10%ほどの割合で検出されたが、それ以降はほとんど検出されなかった (図 5)。以上より、Anammox リアクターの早期立ち上げには効率的な Anammox 細菌の集積培養が重要であることが示唆された。

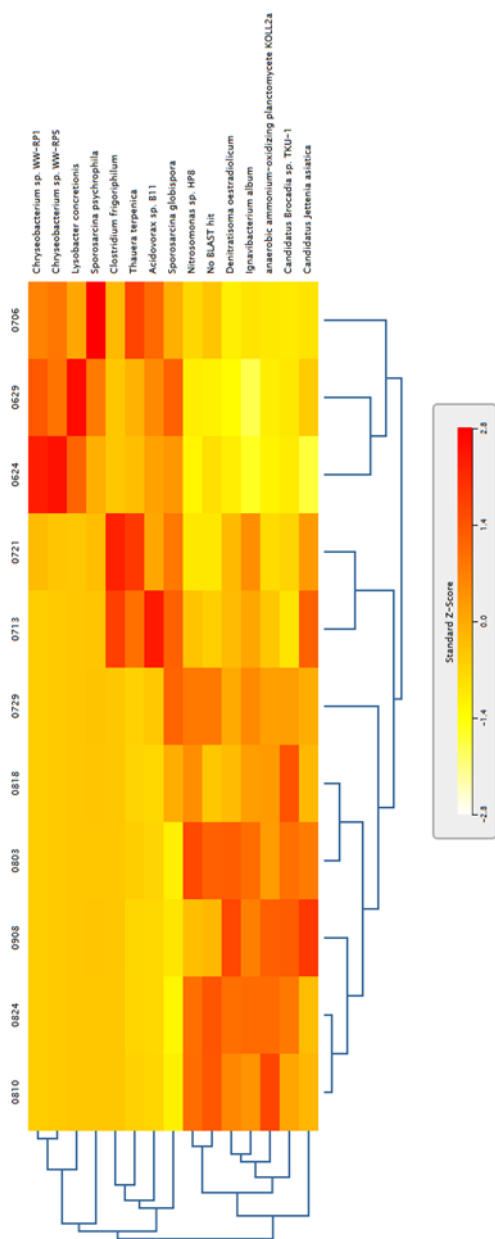


図 5 運転再開後のヒートマップ

また、図 6 に示す自己組織化マップより、安定した処理性のためには、Planctomycetes だけではなく、硝化細菌等を含む Proteobacteria、Actinobacteria やその他の種も重要な役割を担っていることが示唆された。

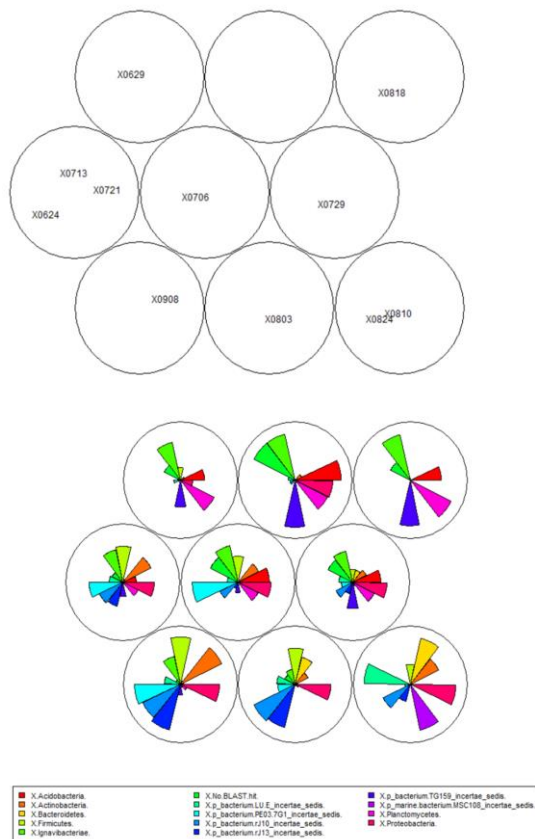


図 6 自己組織化マップ

以上より、本研究では、リアクターグラニューール内に Anammox 細菌、硝化細菌、その他の従属栄養細菌が共存共生しており、リアクターの性能や状態に伴いその存在割合が変遷していることが示唆された。共生する脱窒細菌種の組み合わせにより、 N_2O 削減型の Anammox リアクターが構築できるものと思われる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

Ikuo Tsushima, Atsuko Michinaka, Keita Takaki, Hiroki Itokawa, Masaaki Fukuda, Hiromasa Yamashita, Microbial community analysis in a full-scale anammox demonstration plant. International Anammox Symposium (IANAS2015) p30-31. 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

對馬 育夫 (TSUSHIMA IKUO)

国立研究開発法人土木研究所・主任研究員

研究者番号：50462487