

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26289183

研究課題名(和文) 単槽式メンブレンバイオリアクタによる部分亜硝酸化-Anammox窒素除去法の確立

研究課題名(英文) Establishment of single-stage partial nitritation and anammox by membrane bioreactor for biological nitrogen removal

研究代表者

川越 保徳 (Kawagoshi, Yasunori)

熊本大学・くまもと水循環・減災研究教育センター・教授

研究者番号：00291211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：メンブレンバイオリアクター(MBR)を用いる一槽型部分亜硝酸化-Anammoxプロセスの確立に成功した。方法としては、はじめにアンモニア酸化細菌を植種して部分亜硝酸化プロセスを構築した後、Anammox細菌を植種した。結果として最大窒素除去速度1.45 kg-N/m<sup>3</sup>/dを達成した。細菌叢については、亜硝酸化プロセス時にはNitrosospira属細菌が優占種であったのに対して、部分亜硝酸化-Anammoxプロセス構築後はNitrosomonas属細菌が優占した。Anammox細菌は、植種源での優占種である“Candidatus Brocadia”が優占した。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in establishment of a single-stage partial nitritation and anammox process by membrane bioreactor (PNA by MBR). The strategy is that partial-nitritation (PN) process was established by inoculating ammonium-oxidizing bacteria (AOB) at first and subsequently PNA process was established by inoculating anammox bacteria. As a result, establishment of PNA by MBR was succeeded and maximum-nitrogen removal rate and maximum-nitrogen removal efficiency of 1.45 kg-N/m<sup>3</sup>/d and 89.5% were achieved. The results of bacterial community analysis indicates that genus Nitrosomonas and genus Nitrosospira species are dominant as ammonium oxidizing bacteria, and Candidatus Brocadia” species were dominant.

研究分野：環境工学

キーワード：Anammox 部分亜硝酸化 MBR 一槽型 窒素除去

### 1. 研究開始当初の背景

人間活動による環境への過剰な窒素負荷による閉鎖性水域等での富栄養化や硝酸性窒素による地下水汚染は今なお水環境保全上の課題である。抜本的な解決は排出元での窒素削減であり、具体的には生物学的窒素除去技術の活用が最も有効である。生物学的窒素除去技術には、従来「硝化-脱窒」法が広く用いられてきたが、1990年代後半に発見された Anammox (ANAerobic AMMonium OXidation; 嫌気性アンモニア酸化) と称される新たな窒素代謝を利用する革新的な窒素除去法の開発が期待されている。

Anammox とは、嫌気環境下でアンモニウムイオンが亜硝酸イオンで酸化され、分子状窒素 (N<sub>2</sub> ガス) と少量の硝酸イオンが生成される反応であり、嫌気性独立栄養細菌である Anammox 細菌が触媒する。そこで、アンモニアの約半量を亜硝酸に酸化する部分亜硝酸化反応と Anammox を組み合わせれば、硝化-脱窒法の課題である酸素供給を半減、脱窒に必要な有機炭素源も必要としない省エネルギー、省コスト且つ省スペース型の窒素除去を実現できる。また、上記の部分亜硝酸化と Anammox といった異なる生物反応を単一の反応槽内で行わせることができれば、施設と維持管理のさらなる簡素化が期待できる。

一方、Anammox を水処理技術に応用するにあたっての問題点は、Anammox 細菌の増殖速度が極端に遅く (倍加時間は約 10 日)、標準活性汚泥法の様な浮遊微生物法では、槽内から容易に流出されてしまうことや、環境ストレス等でダメージを受けるとその回復に長期間を有することである。したがって、単一槽での部分亜硝酸化-Anammox 法の確立には、槽内に Anammox 細菌と硝化 (アンモニア酸化) 細菌を保持し、それらの活性を長期に亘って安定に維持できるかが最大の課題となる。

また我々はこれまで、単一槽での部分亜硝酸化-Anammox 法として、SNAP (single-stage nitrogen removal using Anammox and partial nitritation) 法を構築 (Lieu, P.K., et al. (2006) Japan J. Water Treat. Biol., 42 (2), pp. 53-64), 検討したが、本方法では固定床の微生物付着担体を用いるためにスケールアップには不利であり、培養条件やバイオマスの空間的均質性の維持が難しく、処理安定性に欠けることなどの問題が懸念された。

### 2. 研究の目的

我々は、増殖速度が遅い Anammox 細菌を槽内に安定維持すると同時に、懸濁態バイオマスとして槽内に均一に分散させ、処理効率の向上と安定かを図る方法として、メンブレンバイオリアクタ (MBR: Membrane Bio-Reactor) の利用を着想した。この理由は、1) MBR では、膜 (メンブレン) を用いてバイオマスと処理水を分離するため、生育速度

の遅い Anammox 細菌を槽内に安定保持でき、2) 水理学的滞留時間の短縮化による高速連続処理が可能であり、3) バイオマスを槽内で浮遊、流動させる混合型反応槽を構築でき、槽内で空間的に等分布な反応接触効率が期待できるためである。

以上の背景とこれまでの研究を踏まえ、本研究の目的は、MBR を利用する単一槽方式の部分亜硝酸化-Anammox (PNA/MBR) プロセスの確立である。このためにはまず、MBR による亜硝酸化 (PN/MBR) プロセスの確立とその特性の解明が必要となる。また、部分亜硝酸化が分子状酸素 (O<sub>2</sub>) を必要とする酸化反応である一方、Anammox 反応は嫌気条件が望ましいことから、PNA/MBR の確立には、妥当な条件が相反する反応を同一反応槽内で逐次的かつ継続的に維持できる条件を見出すことが不可欠となる。したがって、本研究の最大の目的は、亜硝酸化-Anammox プロセスにおける運転条件の最適化である。さらに、MBR 槽内の細菌叢については、反応の複雑さ故に特殊な状況が想定されることから、その解明と窒素除去・処理能との関係性を明らかにすることも重要な課題である。これらの研究から得られる知見を積み重ねることで、MBR による単一槽での部分亜硝酸化-Anammox プロセスにおける窒素除去能の向上と安定化を図ることとした。

### 3. 研究の方法

本研究は、図 1 に示す検討課題と流れに則って遂行した。

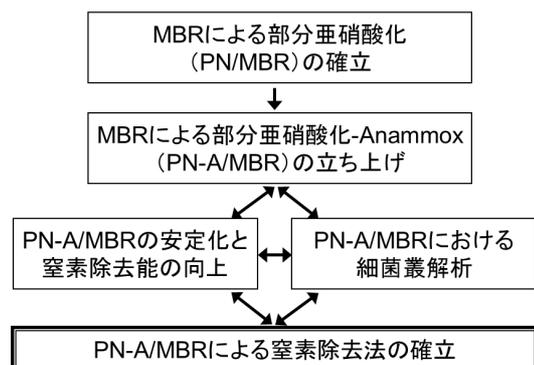


図 1 検討課題と研究の流れ

#### (1) MBR と実験システム

本研究で用いたベンチスケールの MBR 槽と実験システムの概要を図 2 に示す。MBR 槽は容量 3L の透明樹脂製とした。メンブレン (膜) には、塩化ビニル系素材の膜 (平均孔径約 0.3 μm) を不織布で挟み、その周囲を樹脂製の枠で固定したモジュールに整形したものを使用した。MBR 槽内の下部に散気管を設置し、外気あるいは槽内循環での曝気が可能なものとした。MBR 槽内の中央には邪魔板を取り付け、気泡は槽内液に上向流を発生させて膜表面を流れた後、槽内上部にて邪魔板の両側に流れ込んで循環流となり、槽内の混合状態を維持できるようにした。処理

(培養)方式は連続式とし、二つの送液ポンプにて流入、流出させた。槽内温度と pH はコントローラにて制御した。溶存酸素 (DO) 濃度と酸化還元電位 (ORP) は、適宜測定し、必要に応じてコントローラにて曝気制御を行った。

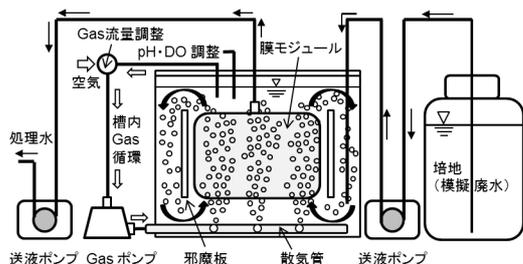


図2 ベンチスケール MBR 実験システム

#### (2) MBR による部分亜硝酸化の確立

MBR において、継続的にアンモニアの約半量を亜硝酸に酸化できる条件を検討した。ここでは、亜硝酸を硝酸に酸化する亜硝酸酸化の抑制とアンモニアを亜硝酸に酸化するアンモニア酸化の適切な制御が鍵となるため、DO、温度、pH 等の制御を主な検討事項とした。具体的には、アンモニア酸化細菌 (AOB) の生育・活動は抑制せずに、亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活動を抑制できる条件を検討した。AOB の植種源 (種バイオマス) には研究室で飼育している活性汚泥を用いた。

#### (3) MBR による部分亜硝酸化-Anammox の立ち上げ

PN/MBR の安定維持が確認された時点で、我々の研究室で培養している Anammox 細菌 (バイオマス) を投入した。部分亜硝酸化と Anammox 反応を同一槽で長期に安定維持するには、AOB と Anammox 細菌の共生培養系構築が不可欠であり、MBR 内に生じるフロック (塊) 状の共生細菌群の形成を図った。

#### (4) PN-A/MBR の安定化と窒素除去能の向上

PN-A/MBR の立ち上げを完了した後、流入水のアンモニア濃度を段階的に引き上げる、あるいは水理学的滞留時間 (HRT) を短縮することで窒素負荷を上昇させた。これによってバイオマスを増大させ、窒素除去能の向上を図った。同時に、温度、pH、DO 濃度、などの諸条件と窒素形態の変化 / 挙動、および窒素除去特性との関係を明らかにした。

#### (5) PN-A/MBR における細菌叢解析

Anammox 細菌の単離と純粋培養は世界的にも成功例がなく、これまでに報告されている Anammox 細菌の培養系は全て共生細菌による。そこで本研究においては、分子生物学的手法、主には遺伝子解析手法を用いて、共生細菌の群衆構造を明らかにした。具体的には、PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法や定量 PCR 法、および High

through put DNA sequence による網羅的な細菌叢の解析を行い、PN-A/MBR の条件や窒素除去特性との関係を明らかにした。

### 4. 研究成果

#### (1) MBR による部分亜硝酸化の確立

図 3 に、60 日間の連続実験期間における、流入水中のアンモニア (アンモニウムイオン) 態窒素 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) 濃度、流出水 (処理水) 中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度 (Inf  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )、流出水中の亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) 濃度 (Eff  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )、流出水中の硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) 濃度 (Eff  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )、および、窒素消失率 (Nitrogen loss efficiency: NLE) の経日変化を示す。

実験開始後、約 19 日間の間は、溶存酸素 (DO) 濃度を  $1.3 \pm 0.1$  mg/L で制御し、部分亜硝酸化の促進を図った。この間、流入水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度が 120 mg/L であるにもかかわらず、流出水中の  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  濃度の合計は 50 mg/L 程度であり、NLE は 60-80% であった。これは、植種源として投入した活性汚泥中に存在する硝化細菌や脱窒細菌などによって、主に内生呼吸による窒素除去が生じたものと考えられる。ただし、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の全てが  $\text{N}_2$  に変換されたのか、一部は  $\text{N}_2\text{O}$  など他の窒素化合物に変換されたのか等については不明である。一方で、流出水中の  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  の生成は抑制しつつ、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  濃度は上昇していることから、亜硝酸化が促進可能であることが分かった。実験開始 20 日以降は、を、Anammox の典型的な化学的当量比である 1:1.3 になるよう  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の酸化を抑制するためにばっ気量を減じて DO 濃度を  $0.9 \pm 0.1$  mg/L で制御した。これによって濃度は減少し、 $\text{NH}_4^+\text{-N} : \text{NO}_2^-\text{-N}$  は 2.0 前後から約 1.3 に減少した。そこで、その後約 1 ヶ月間の間、同条件を継続したところ、NLE が概ね 15% 程度の状態で、 $\text{NH}_4^+\text{-N} : \text{NO}_2^-\text{-N}$  を  $1.15 \pm 0.09$  に維持することができ、部分亜硝酸化プロセスの構築を達成した。

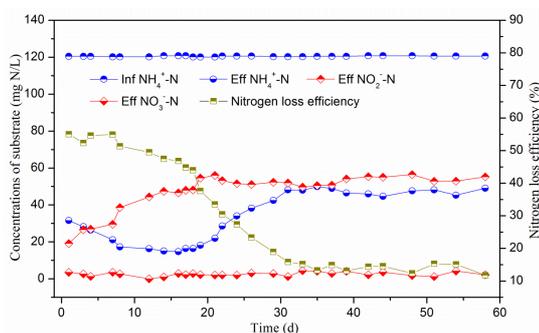


図3 流入水および流出水中の各態窒素濃度の経日変化

図 4 に、AOB に関する系統樹を示す。16S rRNA 配列によるクローンライブラリを作成して細菌叢を解析した結果、AOB として、*Nitrosospira* sp. YKU が優占種であることが分かった。また、*Nitrosospira* sp. YKU は、*Nitrosospira* sp. REGAU (AY635573) と DNA

配列が93%一致することが分かったが、既往研究において、*N. sp. REGAU*の生物学的特性や本種によるアンモニア酸化のメカニズム等に関する情報は殆ど無いことから、部分亜硝酸化における *Nitrosospira sp. YKU* の役割や諸特性の解明が今後の課題である。

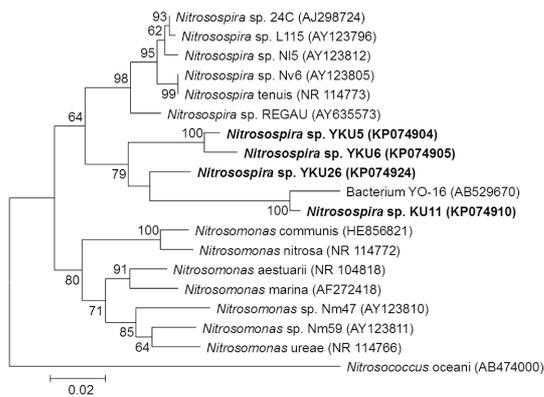


図4 部分亜硝酸化が維持された状態でのMBR槽内バイオマスのAOBに関する系統樹

## (2) MBRによる部分亜硝酸化-Anammoxの確立

部分亜硝酸化プロセスの構築後、アンモニア負荷速度 (ALR: Ammonium Loading Rate) を  $0.24 \text{ kg N/m}^3/\text{d}$  に設定し、約1ヶ月間は部分亜硝酸化プロセスを継続した。その後、Anammox バイオマスを添加し、流入水中の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度を  $120 \text{ mg/L}$  から段階的に上げるとともにHRTを12hから徐々に減じることでALRを上昇させ、部分亜硝酸化-Anammox プロセスを立ち上げ、窒素除去能の向上を目指した。

図5に、流入水中の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度と流出水 (処理水) 中の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ , および  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  濃度をHRTとともに示す。約1ヶ月間で窒素除去率 (NRE) は、15.1%から87.7%に上昇し、アンモニアと亜硝酸の同時除去が確認された。そこで、ALRを段階的に引き上げたところ、負荷を上昇させた直後は流出水中に  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  が残存するものの、約30日間で  $5 \text{ mg/L}$  未満まで減少し、最終的に1年間 (360日) で、 $1.62 \text{ kg N/m}^3/\text{d}$  のALRにて85%以上のNREが得られ、 $1.45 \text{ kg N/m}^3/\text{d}$  の窒素除去速度 (NRR) を達成した。

また、16S rRNAによるクローンライブラリ解析と次世代シーケンサーによる網羅的細菌叢解析を行った結果、AOBについては、亜硝酸化のみのプロセス継続時に優占種であった *Nitrosospira sp. YKU* よりも、*Nitrosomonas* 属細菌が優占していることが明らかとなった。さらに、Anammox細菌については、植種源に用いたAnammoxバイオマスの優占種である "*Candidatus Brocadia* TKU" が優占していることが分かった (図6)。

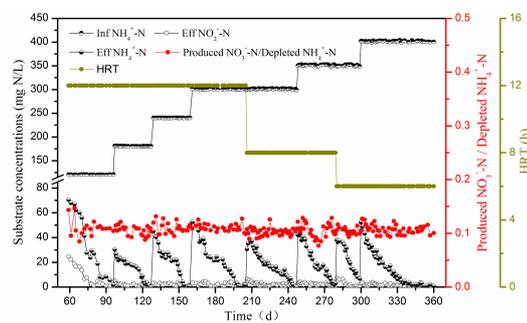


図5 流入水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度と流出水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  濃度の経日変化

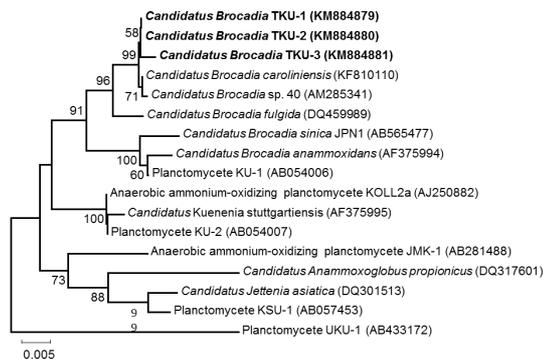


図6 部分亜硝酸化-Anammox プロセス構築後のAnammox細菌に関する系統樹

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- 1) X. Huang, K. Sun, Q. Wei, K. Urata, Y. Yamashita, N. Hong, T. Hama, Y. Kawagoshi, One-stage partial nitritation and anammox in membrane bioreactor, Environ. Sci. Pollut. Res., Vol. 23 (11), 11149–11162, 2016
- 2) Q. Wei, Y. Kawagoshi, X. Huang, N. Hong, L.V. Duc, Y. Yamashita, T. Hama, Nitrogen removal properties in a continuous marine anammox bacteria reactor under rapid and extensive salinity changes, Chemosphere, Vol.148, 444-451, 2016
- 3) X. Huang, K. Urata, Q. Wei, Y. Yamashita, T. Hama, Y. Kawagoshi, Fast start-up of partial nitritation as pre-treatment for anammox in membrane bioreactor, Biochem. Eng. J., Vol.105, 371–378, 2016
- 4) Q. Wei, X. Huang, Y. Tomoshige, N. Hong, T. Hama, Y. Kawagoshi, Comparative Study on HRT and Nitrogen Concentration Effects on Enhancement of Nitrogen Removal by Marine Anammox Bacteria (MAB), J. Water Environ. Technol., Vol.13, 119-130, 2015

[学会発表] (計15件)

- 1) Y. Koga, Y. Yamashita, H. Ito, T. Hama, Y. Kawagoshi, Nitrogen-removal performance and bacterial community by mixed-culture of marine- and freshwater-anammox bacteria

- under different salinity conditions, Water and Environment Technology Conference, Chuo Univ., Japan, 8/27-28, 2016
- 2) Q. Wei, X. Huang, L.V. Duc, K. Urata, N. Hong, T. Hama, Y. Kawagoshi, Effect of pH on nitrogen removal performance in a continuous marine anammox bacteria reactor. Water and Environment Technology Conference, Nihon Univ., Japan, 8/5-6, 2015
  - 3) Q. Wei, Long-term effect of salinity on nitrogen removal performance of marine anammox bacteria, The 2<sup>nd</sup> IWA Malaysia Young Water Professionals Conference (YWP15), Vivatel Kuala Lumpur, Malaysia, 3/12-14, 2015
  - 4) X. Huang, Fast startup of partial nitrification as pretreatment for anammox in membrane bioreactor, The 2<sup>nd</sup> IWA Malaysia Young Water Professionals Conference (YWP15), (3/12-14, 2015, Vivatel Kuala Lumpur, Malaysia, 3/12-14, 2015
  - 5) X. Huang, K. Sun, Q. Wei, K. Urata, Y. Yamashita, N. Hong, T. Hama, Y. Kawagoshi, One-stage partial nitrification and anammox in membrane bioreactor, Proceedings of 5<sup>th</sup> International GelK (International Joint Education Program for Groundwater Environmental Leaders, Kumamoto University) Symposium, Kumamoto Univ., 12/1, 2014
  - 6) 池田啓輔, 伊藤紘晃, ルオンバンドック, 濱武秀, 川越保徳, MBR を用いた一槽型部分亜硝酸化-Anammox の再構築を目的とする Anammox 反応からの立ち上げに関する研究, 平成 29 年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会, 熊本大学, 2018 年 3 月 10 日
  - 7) 山下祐貴, 古賀圭紀, 濱武英, 川越保徳, メンブレンバイオリアクタ内の固液中成分と生息微生物の特徴に関する基礎的研究, 日本水処理生物学会第 52 回大会, 北九州市立大学, 2015 年 11 月 11 日-13 日
  - 8) 川越保徳, 黄曉武, 濱武英, ルオンバンドック, 平膜浸漬型 MBR による一槽型部分亜硝酸化-Anammox 法の確立に関する基礎的研究, 日本水処理生物学会第 52 回大会, 北九州市立大学, 2015 年 11 月 11 日-13 日
  - 9) 孫凱航, 黄曉武, 韋巧艶, ルオンバンドック, 洪念, 濱武英, 川越保徳, MBR を用いた一槽型リアクターでの部分亜硝酸化-Anammox 法 による安定的な窒素除去, 第 49 回日本水環境学会年会, 金沢大学, 2015 年 3 月 16-18 日
  - 10) 孫凱航, 黄曉武, 韋巧艶, ルオンバンドック, 洪念, 濱武英, 川越保徳, MBR を用いた一槽型の部分亜硝酸化 Anammox による窒素除去能力の検討, 平成 26 年度日本水環境学会九州支部研究発表会, 鹿児島高専, 2015 年 2 月 28 日

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

川越 保徳 (KAWAGOSHI YASUNORI )  
熊本大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号 : 00291211

### (2) 研究分担者

惣田 訓 (SOUA SATOSHI )  
大阪大学・工学研究科・准教授  
研究者番号 : 30322176  
森村 茂 (MORIMURA SHIGERU )  
熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号 : 20230146  
濱 武秀 (HAMA TAKEHIDE )  
熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号 : 30512008

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし