

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340061

研究課題名(和文) 低温耐性硝化細菌を用いた硝化処理操作因子の解明と処理システムの構築

研究課題名(英文) Development of biological nitrogen removal system using psychrotrophic nitrifiers

研究代表者

角野 立夫 (SUMINO, TATSUO)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：60531077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：NH₄-N 40mg/L 含有の下水(BOD除去済み、循環変法を想定)を低温耐性硝化担体で処理した結果、10℃で処理水NH₄-N 1.5 mg/L以下を得た。硝化速度0.25～0.30 kg-N/m³/dayを得、実下水で低温硝化が可能であることを確認できた。担体の菌叢を次世代アンブリコンシーケンス解析した結果、全リード数23,848のうち2%がNitrosomonadaceae科と少なく、低温硝化に関する特異的な菌叢は見出されなかった。さらに、実用化に向けて安価で軽量化可能な新規材料で活性汚泥を包括固定した。この担体を用い4～5℃での安定した処理が可能であることを検証した。

研究成果の概要(英文)：Continuous treatment of nitrification was operated using psychrotrophic nitrifiers accumulated from activated sludge. Influent NH₄-N of 40 mg/L of domestic wastewater was removed to below 1.5mg/L by a loading of 0.25-0.30 kg-N/m³/day at 10C. Molecular analysis of bacterial community structure was applied to the carrier using a next-generation sequencer. Two percent of 23,848 reads was Nitrosomonadaceae. To apply for commercial plant, new immobilized pellet using low cost and low specific gravity was developed. A high nitrification rate of 0.16-0.20 kg-N/m³/day was obtained using new immobilized pellet at 4-5C.

研究分野：環境技術・環境材料

キーワード：硝化 窒素処理 硝化細菌 下水処理 アンモニア 低温 固定化微生物 産業廃水処理

1. 研究開始当初の背景

廃水中に含まれる窒素成分である有機態窒素、アンモニア態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$)、亜硝酸態窒素 ($\text{NO}_2\text{-N}$) および硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) は水圏における富栄養化の原因となるため、環境保全の観点からその除去が課題となっている。下水中に含まれる窒素成分の大半は $\text{NH}_4\text{-N}$ として存在しており、その除去は硝化菌および脱窒菌による生物学的硝化脱窒法が主流である。特に、生物学的硝化脱窒法の律速は硝化であり、 15°C 以下の低温では処理が困難である。硝化を安定して行わせ運転しなければ脱窒が期待できないことから、低温での安定した硝化技術開発が必要となっている。

2. 研究の目的

これまで研究代表者らは低温で硝化処理が可能な担体をデザイン化している (2011～2013 年度、科研費 23510106)。高濃度アンモニア含有合成廃水 ($\text{NH}_4\text{-N}$ 700 mg/L) で包括固定化活性汚泥担体を馴養することにより AH 菌群 (低温耐性の硝化菌) を馴養でき、水温が及ぼす硝化速度への影響を評価している。この担体を用いて下水処理向け低温硝化を想定した低濃度アンモニア含有合成廃水 ($\text{NH}_4\text{-N}$ 40 mg/L) における 10°C での限界負荷 $0.36\text{kg-N/m}^3/\text{d}$ を得ている。そこで本研究ではさらに実用化する為に実下水での処理を検証し、最適システムの構築を図るために必要な安価な担体を提案することとした。特に実用化が可能な安価な固定化材料、安価な材料を用いての低温硝化細菌の馴養と低温硝化の検証、現場で製造できる包括固定化担体の球形造粒方法、低温硝化技術の活用出口としての養殖場向け処理の検証を検討した。

3. 研究の方法

(1) 微生物の包括固定化方法

群馬県板倉町水質浄化センターの返送汚泥を包括固定用の種汚泥として供試した。実廃水の処理に供試した担体はエチレングリコール系プレポリマー (14EG) を使用した。研究代表者らの手法に準じ、活性汚泥をプレポリマーで包括固定し、3 mm 角形の担体を供試した。新規な担体開発には固定化材料の母材としてヒドロキシシラクリレート (HOA) を、架橋材としてジエチレングリコールジメタクリレートを使用した。HOA は機能性化学品として大量に生産されている材料である。HOA とジエチレングリコールジメタクリレートともに共栄化学株式会社製を用いた。母材と架橋材の混合液に種汚泥を懸濁させ研究代表者らの手法²⁾ に準じて重合させた。重合したものを 3mm 角型に成形し以下の廃水処理試験に供試した。これとは別途、同様な組成で球形造粒した球形担体も作製し供試した。作成した担体は含水ゲル状でゲルの内部に活性汚泥が封じ込められた担体である。

(2) 実験装置と低温耐性菌集積培養方法

供試廃水の組成を表 1 に示す。硝化細菌の馴養及び処理運転に用いた装置を図 1 に示す。実容積 1.15 L の角型リアクターである。リアクターの上部に原水が流入し、側面の担体分離部 (1.5 mm メッシュのナイロン網) から処理水が流出する構造である。空気量 3 L/min で曝気した。pH は 5 % (w/v) NaHCO_3 溶液を用いて常時 7.5 に制御 (下限値設定) した。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度 400 mg/L の無機合成廃水を流入させ、常温 ($23\sim 25^\circ\text{C}$) において連続運転を行った。水理学的滞留時間 (HRT) は運転開始時の 24 h から高負荷運転時の 3 h で原水流量を調節し運転した。原水および処理水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ および $\text{NO}_3\text{-N}$ を分析し硝化性能を評価した。原水および処理水は $0.45\text{ }\mu\text{m}$ メンブレンフィルターでろ過し、ろ過液について $\text{NH}_4\text{-N}$ はインドフェノール青吸光光度法 (JIS-K0102) に準じ、 $\text{NO}_2\text{-N}$ および $\text{NO}_3\text{-N}$ はイオンクロマトアナライザー (日本ダイオネクス(株)製、ICS-1600) で分析した。

表 1 無機合成廃水 ($\text{NH}_4\text{-N}$ 400mg/L)

薬品名	含有量 (g/L)
NH_4Cl	1.528
NaHCO_3	3.515
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.231

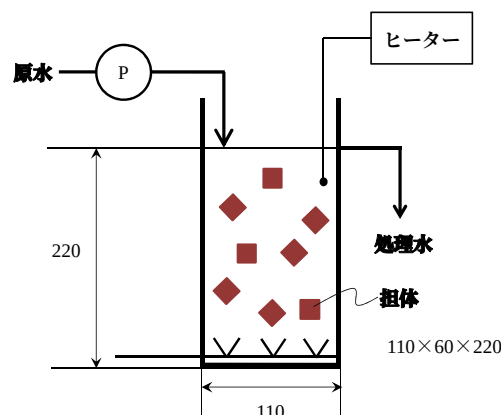


図1 連続処理実験装置

(3) リアルタイム PCR 解析方法

アンモニア酸化細菌が有するアンモニア酸化酵素遺伝子 *amoA*、亜硝酸酸化細菌 *Nitrobacter* 属の有する亜硝酸酸化還元酵素遺伝子 *norB* を標的として、担体 1 g あたりのコピー数を調べた。前処理として PVA 担体からの生物膜の剥離と分散にはホモジナイザーと超音波処理を用い、研究代表者らの条件に準じて行った。DNA 抽出は、MORA-EXTRACT kit (Kyokuto Pharmaceutical, Tokyo) を用いて行った。PCR では、プライマーをそれぞれアンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA* 遺伝子: *amoA*-F1-*amoA*-2R)、亜硝酸酸化還元酵素遺伝子 (*norB* 遺伝子: *NxrB*-F1-*NxrB*-1R) とし、スタンダード DNA を *Nitrosomonas europium* NBRC14298 (*amoA* 遺伝

子コピー数測定用), *Nitrobacter winogradskyi* NBRC14297(*norB* 遺伝子コピー数測定用)とした。スタンダード試薬は SYBR®Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (Takara, Shiga), MightyAmp®for Real Time(SYBR®Plus)(Takara, Shiga)を用い, リアルタイム PCR 装置は Rotor-Gene™ Q(QIAGEN, Germany)を用いた。

16S rDNA を標的として得られた DNA 増幅産物 (アンプリコン) をシーケンスすることで DNA 塩基配列を決定し, 細菌の帰属分類群の推定を行った。リアルタイム PCR 解析で用いた抽出 DNA を鋳型として, プライマーセット 341F/R806 を用いて, 細菌 16S rDNA V3-V4 領域を対象とした PCR 増幅を行うとともに, 各試料を判別するためのバーコード配列を付加した。各試料について, 得られたアンプリコンを次世代シーケンス装置 MiSeq (Illumina, USA)に供して, (2 x 250bp)ペアエンドによるシーケンス解析を行った。得られたリードは, fastq-join program によって連結し, 連結できないリードは排除した。それぞれのフィルタリングで残ったリード (fasta 配列) のみを以降の解析に使用した。各リードは, Ribosomal Database Project (RDP) Multiclassifier V1.1 (80% confidence threshold) によって, 細菌の帰属分類群の推定を行った。

4. 研究成果

(1) 下水処理での低温硝化の検証

活性汚泥循環変法での硝化槽における低温硝化を想定し, 最終沈澱池処理水に $\text{NH}_4\text{-N}$ 40 mg/L を添加した排水を原水として低温での硝化处理実験を行った。原水は本来ならば, BOD 成分が少なく, 残留 $\text{NH}_4\text{-N}$ が多い脱窒槽流出水を用いての実験が理想であるが, 実験に安定供給できる最終沈澱池処理水にアンモニアを添加して検討した。

前報 (2011~2013 年度, 科研費 23510106) で報告した AH 菌馴養時の水温変動試験に使用した担体を用い実下水 (最終沈澱池処理水に $\text{NH}_4\text{-N}$ 40 mg/L 添加) を水温 10°C, HRT 4.0 h で連続硝化处理運転を行った結果を図 2 に示す。連続運転開始 3 日目で $\text{NH}_4\text{-N}$ 34.5 mg/L が処理されずに残った。実下水は最終沈澱池流出水であり, アルカリ度 (無機炭素) およびリンが不足していると考えられた。原水にアルカリ度として NaHCO_3 を, リンとして $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を加えたところ, 2 日後には処理水 $\text{NH}_4\text{-N} < 2.0$ mg/L 減少し, 1 週間後には処理水 $\text{NH}_4\text{-N} < 0.3$ mg/L まで減少した。実際の循環変法においては無機塩類のバランスが十分であり, 今回は $\text{NH}_4\text{-N}$ 40 mg/L 添加したことによる栄養塩類不足と考える。合成廃水処理時の水温変動試験では亜硝酸型であったが本実験では硝酸型で安定した。これは低水温において担体内の菌叢が安定し硝酸型へと遷移したものと考えられる。実際の処理場において亜硝酸型硝化では亜酸化窒

素 (N_2O) が生成されやすいため硝酸型硝化が望まれている。本法では安定した硝酸型硝化を行う担体を提供でき, 低温硝化に用いても硝酸型硝化として処理できる。担体内の硝化菌の生菌数計測結果は運転 40 日目で $\text{AOB } 4.4 \times 10^9$, $\text{NOB } 1.6 \times 10^8$ コピー数/g-担体に達した。その後, 処理水 $\text{NH}_4\text{-N}$ 1.5 mg/L 以下で安定した。硝酸型反応で推移し, 10°C で硝化速度 $0.25 \sim 0.30$ kg-N/ m^3 /day を得た。この値は常温での処理施設の一般的な設計値と同等であり, 下水処理における低温耐性包括固定化担体の実用性が示唆された。また, 次世代アンプリコンシーケンス解析による菌叢解析結果として, 門に着目すると, *Bacteroidetes* 門, *Proteobacteria* 門, *Acidobacteria* 門に特徴が見られる。この *Proteobacteria* 門に *Nitrosomonadaceae* いわゆる硝化菌が属している。しかし今回, 低温硝化を確認できた担体では *Nitrosomonadaceae* が全菌に対し, 2% と相対的に少ない値となった。低温硝化細菌に関する特異的な菌叢は見出されなかった。

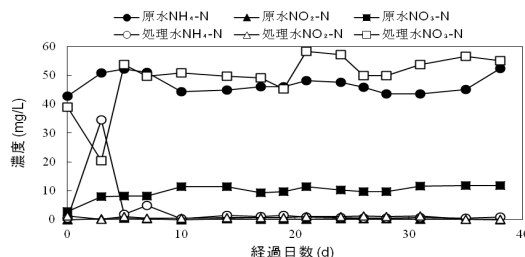


図 2 実下水での低温硝化連続処理
運転結果 (10°C)

(2) 新規担体を用いた低温耐性菌集積培養

実用化に向け, 安価な HOA 担体を用い低温耐性硝化細菌を集積培養した結果を図 3 に示す。反応は亜硝酸型で進行し, 処理水 $\text{NH}_4\text{-N}$ は 58mg/L 以下で推移した。期間中の溶存酸素濃度は 4 mg/L 以上を維持した。運転 800 日間での担体の物性と活性は安定しており, 十分に実用化が可能な担体と判断できる。容積負荷と硝化速度の関係を図 4 に示す。負荷を変更したときに除去率が一時的に悪化した, 容積負荷 $0.5 \sim 3.2$ kg-N/ m^3 /day でアンモニアの除去率 80% 以上での安定処理ができ高速処理運転が可能であることが示唆された。従来法の硝化速度と比較すると, 本実験で馴養した担体の硝化速度は最大で $2.8 \text{ kg-N}/\text{m}^3/\text{day}$ を得たのに対し, 硝化菌グラニューールではそれぞれ $1.1 \text{ kg-N}/\text{m}^3/\text{day}$, $1.2 \text{ kg-N}/\text{m}^3/\text{day}$ が報告されている。この値と比較して, 高い硝化速度を得た。アンモニア酸化酵素遺伝子 *amoA*, *Nitrobacter* 属の有する亜硝酸酸化還元酵素遺伝子 *norB* を標的としたリアルタイム PCR 解析した。その結果, 硝化速度 $1.63 \text{ kg-N}/\text{m}^3/\text{day}$ の担体では, *amoA* が 1.19×10^{11} コピー/g-担体, *norB* が 2.85×10^{10} コピー/g-担体を得た。

$\text{NH}_4\text{-N}$ 400mg/L の処理運転を 800 日間行い、その後、低濃度（下水処理を対象）での高速処理の可能性を検討するために $\text{NH}_4\text{-N}$ 40mg/L の合成廃水を滞留時間 20~40 分で処理運転した。処理運転で得られた水質から換算した硝化速度を $\text{NH}_4\text{-N}$ 400mg/L の処理での硝化速度と比較した。結果を図 4 に先の結果と合わせて示す。硝化速度 0.9~2.3 kg-N/m³/day を得た。下水での硝化は 0.3 kg-N/m³/day 前後が一般的な設計であり、極めて高い速度が得られた。

運転期間中、担体は膨潤しそれに伴い充填率が增大した。運転 203 日目と 384 日目に担体を引き抜き、別の処理実験に供試した。384 日目に引き抜いた担体は 3.2 項での養殖場向け低濃度 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含有排水の処理に供試した。担体は 203 日で 3.2 倍に膨潤し、384 日目に引き抜き後の 1.3 倍、さらに 531 日に引き抜き後の 1.3 倍に膨潤した。積算すると運転開始日から 531 日目までに 5.4 倍膨潤したことになる。このことは担体の容積あたりの単価を膨潤により 1/5.4 に低減できる。531 日目の担体の比重は 1.01 に達した。充填率 30~40% で流動可能な軽量化担体である。このように膨潤しながら物性を保てるのは、担体製造時の重合度と架橋密度の増大によると考えられる。

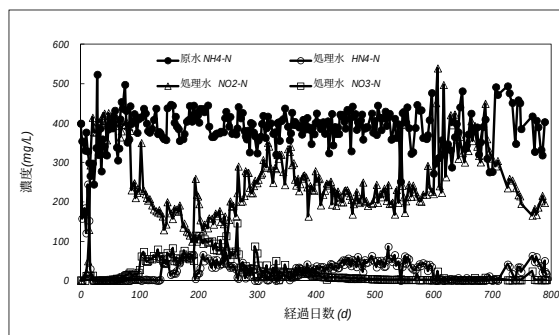


図 3 連続処理実験結果($\text{NH}_4\text{-N}$ 400mg/L 処理)

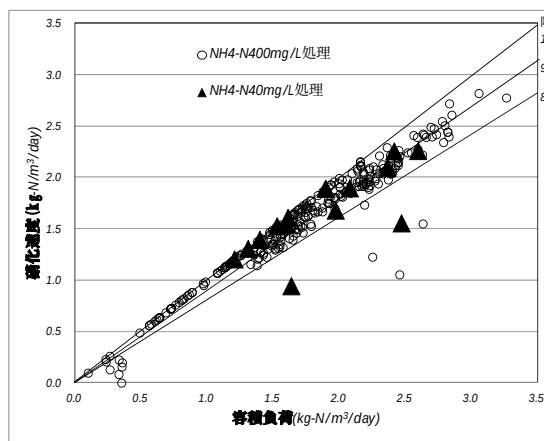


図 4 容積負荷と硝化速度の関係
($\text{NH}_4\text{-N}$ 400, 40mg/L 処理)

(3) 低温での処理特性

① 下水処理向け $\text{NH}_4\text{-N}$ 40mg/L 含有無機合成廃

水の低温処理

前項で培養した硝化担体（運転 384 日目の担体を引き抜き使用）を用いて低水温での硝化特性を検討した。研究代表者らはすでに中高濃度 $\text{NH}_4\text{-N}$ で培養した硝化担体は低水温で活性がある事を見出し、長期間に渡り処理安定性のある事を報告している。前項で培養した担体は中濃度の $\text{NH}_4\text{-N}$ 400mg/L で培養した担体で、低温耐性があると判断でき処理実験を行った。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 40mg/L の無機合成廃水（表 1 の無機合成廃水を $\text{NH}_4\text{-N}$ 40mg/L に水道水で希釈し使用）を用い、硝化槽の水温を 15℃ から 5℃ に順次設定し、滞留時間 5~6h で処理運転を行った。実験は処理装置や原水タンクを 5℃ 恒温槽に設置し、ヒータで加温し水温を設定した。結果を図 5 に示す。運転開始してしばらくは処理水 $\text{NH}_4\text{-N}$ が 7~18 mg/L と不安定な処理であったが、その後安定し、10~15℃ で処理水 1mg/L 以下を得た。5℃ では若干亜硝酸の生成が見られたが、ほぼ安定した硝酸型の硝化が得られた。

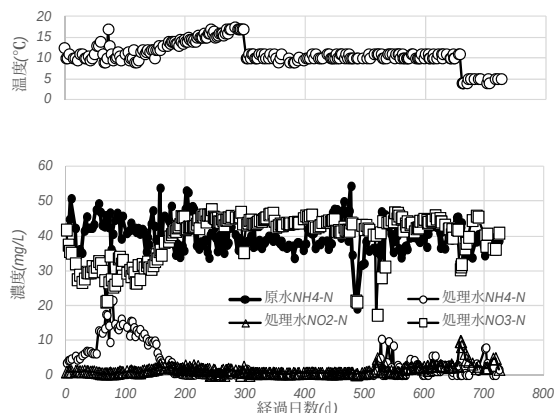


図 5 低水温での連続処理運転結果
(5℃, $\text{NH}_4\text{-N}$ 40mg/L 処理)

② 養殖場向け低濃度 $\text{NH}_4\text{-N}$ の低温処理

水産養殖業や水族館での水質管理においては、アンモニア性窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$) が魚類の成長を阻害するため、硝化細菌を用いた $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去（硝化）が行われている。しかし低水温で且つ低濃度の硝化反応は難しく知見が少ない。前項で用いた低温耐性のある担体を用いて低水温下での低濃度硝化が可能であるかを検討した。目標値は原水 $\text{NH}_4\text{-N}$ 1mg/L に対し、処理水 $\text{NH}_4\text{-N}$ 0.1 mg/L 以下とした。硝化槽として 3 槽直列でつなげた 3 段処理装置を用いた。原水 0.8~1.6 mg/L が 1 槽目に流入し、1 槽目の担体に接触し硝化処理され 2 槽目に流入する。2 槽目の担体と接触し硝化処理され 3 槽目に流入し、同様に 3 槽目で処理され処理水が流出する。3 槽の合計の滞留時間 4~6h で運転を行った。装置は 5℃ の恒温槽に設置し運転した。処理水 $\text{NH}_4\text{-N}$ の分析はナフトール法を用いた。結果を図 6 に示す。処理水 $\text{NH}_4\text{-N}$ 0.1 mg/L 以下、除去率 90% 以上を得、硝酸型で進行した。低水温で低濃

度の処理が可能であることを見出した。アンモニア酸化酵素遺伝子 *amoA* を標的としたリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、運転終了時の 1 槽目、2 槽目、3 槽目のそれぞれの担体の *amoA* が 4.27×10^6 コピー/g-担体、 7.57×10^7 コピー/g-担体、 2.00×10^6 コピー/g-担体のコピー数を得た。

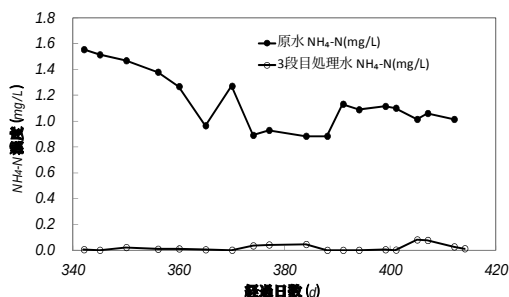


図6 3段階処理運転結果（5℃処理運転）

(4)球形担体での処理

インドや中東諸国では産業の急速な発展により水圏の汚染が進み、飲料水の確保が課題となっている。汚染河川水を対象としてBODと窒素を処理し、飲適水質に近づけるまで浄化することを目的とした浄化技術の開発が急務である。安価な装置を提供するため、担体の簡易な製造設備を研究代表者らは検討している。下水処理場のサイトで3mm球形の包括固定化担体を製造し、硝化槽に担体を投入できる設備である。ここでは球形担体の硝化処理性能を紹介する。HOA材料と活性汚泥を混合した懸濁液を重合させながら球形造粒した。製造した3mm球形担体を図1の装置に20%充填した。この装置で $\text{NH}_4\text{-N}$ 20～70mg/Lの無機合成廃水を用い滞留時間3～6hで処理運転を行った。結果を図7に示す。運転開始後の10日前後で処理は安定し、硝化速度 $0.12 \sim 0.32 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ を得た。物性と活性ともに安定しており、今後、現場サイトでの造粒設備の試作と排水処理運転の検証を行う予定である。

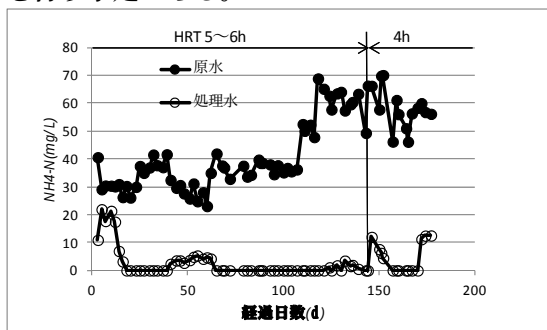


図7 球形担体での連続処理運転結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

①角野立夫：下水や産業排水処理向け軽量化包括担体の開発、ケミカルエンジニアリ

ング、Vol.61、No.6、389-394（2016）

査読なし

②角野立夫：軽量化包括固定化微生物担体を開発、大学技術工房、vol.6、62（2016）

査読なし

〔学会発表〕（計5件）

①角野立夫：次世代包括固定化微生物技術、川崎国際環境技術展2016（とどろきアリーナ（川崎市）、2016/2/18～19）

②角野立夫：軽量化包括固定化微生物担体の開発、（独）科学技術振興機構主催平成27年度新技術説明会（JST 東京本部別館（東京都千代田区）、2015/9/15）

③田村彩、角野立夫：新規包括材料で作製した包括固定化硝化菌担体の処理特性、化学工学会新潟大会（新潟大学（新潟市）、2014/11/22）

④小暮 元輝、大竹 越、角野 立夫：高濃度アンモニア含有廃水で馴養した包括固定化活性汚泥担体の低温硝化特性、第51回下水道研究発表会（大阪アカデミア（大阪市）、2014/7/22）

⑤木村勇貴、田端良祐、角野立夫、濱本 亜希、小林政行：包括固定化微生物担体を用いた実下水での低温硝化検討、日本水処理生物学会第51回大会（山梨県 JA 会館（甲府市）、2014/11/12-14）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：包括固定化担体及びそれを用いた廃水処理装置

発明者：角野立夫 権利者：東洋大学

種類：特許

番号：2014-219064

出願年月日：平成26年10月28日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

①東洋大学シーズ集（軽量化担体）

<http://www.toyo.ac.jp/uploaded/attachment/17055.pdf>

②東洋大学シーズ集（低温硝化）

<http://www.toyo.ac.jp/uploaded/attachment/17057.pdf>

③角野研究室紹介

<http://www2.toyo.ac.jp/~sumino/>

④日経産業新聞「下水処理、利用する細菌固定」（2015、11月19日）

⑤日経ビジネス「下水や産業廃水の窒素処理に有用微生物を活用する技術を開発」（2015年12月28日・2016年1月4日合併号）

6. 研究組織

(1)研究代表者

角野 立夫（SUMINO TATSUO）

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：60531077