

平成30年 6月24日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12622

研究課題名(和文) anammox汚泥によるヒドラジン排水の生物処理法の開発

研究課題名(英文) Development of biological treatment method of hydrazine-containing wastewater using anammox sludge

研究代表者

西山 孝 (NISHIYAMA, Takashi)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：00425331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドラジンを含んだ排水の生物処理法の開発を目的とし、anammox汚泥を利用してどの程度までヒドラジンを除去できるか、除去の代謝系はどうなっているか、を明らかにする実験を行った。その結果、安定処理可能なヒドラジン濃度、ヒドラジン負荷速度、ヒドラジン処理速度の上限はそれぞれ、60 mg-N/L、0.45 kg-N/m<sup>3</sup>/day、0.40 kg-N/m<sup>3</sup>/dayであった。ヒドラジン除去には、硝酸の一酸化窒素への還元、一酸化窒素とアンモニアによるヒドラジン合成、ヒドラジンの窒素ガスへの酸化、ヒドラジンの窒素ガスとアンモニアへの不均化、の4反応が関与していると推察された。

研究成果の概要(英文)：To develop the biological treatment method of hydrazine-containing wastewater, we conducted experiments to clarify (1) how much hydrazine can be removed using anammox sludge and (2) what is the metabolic system of hydrazine removal. As a result, the upper limits of hydrazine concentration, hydrazine loading rate and hydrazine removal rate were 60 mg-N/L, 0.45 kg-N/m<sup>3</sup>/day, and 0.40 kg-N/m<sup>3</sup>/day, respectively. It was inferred that the metabolism of hydrazine removal was composed of four reactions, reduction of nitrate to nitric oxide, synthesis of hydrazine with nitric oxide and ammonium, oxidation of hydrazine to molecular nitrogen, and disproportionation of hydrazine to ammonium and molecular nitrogen.

研究分野：微生物遺伝子工学

キーワード：anammox ヒドラジン 生物処理

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ヒドラジン( $N_2H_4$ )は強力な還元剤で、常温の水中ではゆっくり酸素と反応する( $N_2H_4 + O_2 \rightarrow N_2 + 2H_2O$ )ためボイラー配管や火力・原子力発電所の熱交換器配管などの腐食を防ぐための脱酸素剤(防錆剤)として使用されている。日本では年間約5,000トンのヒドラジンが使用されており、未反応のヒドラジンを含む排水が排出されている。ヒドラジンは生物毒性が強く、変異原性も指摘されており、環境への影響が懸念されている。またヒドラジンは小型乗用車向けの燃料電池への応用も研究されており、実用化が達成された場合は、製造および廃棄工程でヒドラジンを含む排水が多量に発生すると予想される。

排水中のヒドラジンは化学的酸素要求量(COD)を高めるため、CODの排水基準値を満たすまで希釈処理されることがある。この方法では希釈水が多量に必要となる一方で、ヒドラジンの総排出量は減少せず、環境負荷は低減できない。ヒドラジンの化学的除去法として、過酸化水素水などの酸化剤の添加、金属触媒存在下での曝気処理などにより、ヒドラジンを窒素ガスに酸化分解する方法などがあるが、これらの方法では、余剰酸化剤や処理水に混入する副生成物を除去する付加処理が必要となる。また、加温や曝気動力のコストが必要となる。

(2) anammox 菌は1990年代に発見された細菌で、アンモニアと亜硝酸を取り込み両者の酸化・還元により窒素ガスへと脱窒する( $NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O$ )。近年、anammox 菌がヒドラジンを代謝中間体として生合成し、さらにヒドラジンを窒素ガスへ酸化することが知られるようになった。研究代表者らは、それら機構に関わる酵素の機能解明を行ってきたが、その過程で anammox 菌が外来のヒドラジンをも嫌氣的に酸化除

去できるのではないかと着想した。このヒドラジン生物処理法が可能であれば、アルカリ剤などの投入、加温、処理後に残留する余剰酸化剤の付加的処理が不要で、既知の無機的方法に比べ経済的にヒドラジンを処理できると思われた。実際に小型の anammox リアクタに低濃度のヒドラジン含有排水を供したところ、硝酸塩添加時にヒドラジン除去が継続的に行われ、実現可能と推察された。

## 2. 研究の目的

anammox 菌を利用したヒドラジン生物処理法を開発するために、実験室レベルのリアクタで、どの程度のリアクタ容積負荷速度、容積処理速度までヒドラジンを処理できるか明らかにする、ヒドラジン除去の化学量論と代謝系を決定する、ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用リアクタ

0.2 L および 5 L のラボスケール上向流リアクタに、それぞれグラニュール状および不織布担体に付着した anammox 汚泥を入れた。0.2 L リアクタは複数本使用した。

### (2) リアクタの処理能力の決定

どのリアクタも通常の anammox 培地で数週間運転した後に、ヒドラジン添加培地での運転を開始した。まず、培地流速一定でヒドラジン濃度を徐々に上昇させる運転を行い、ヒドラジン濃度の上限を決定した。その後、上限のヒドラジン濃度で培地流速を上昇(水理的滞留時間を減少)させる運転を試み、どの程度の負荷速度までヒドラジン処理が安定か決定した。

### (3) ヒドラジン除去反応の化学量論の決定

リアクタの運転期間中、リアクタ流入水と排水に含まれる窒素成分(アンモニア、亜硝酸、硝酸、ヒドラジン)の濃度および発生した窒素ガス量を測定した。これら各成分の

収支から、ヒドラジン除去反応の化学量論を決定した。

(4) ヒドラジン除去反応の代謝系の解明  
決定された化学量論と anammox 菌のゲノムデータから、ヒドラジンの分解除去に関わる酵素を推定した。これら酵素の遺伝子がヒドラジン存在下で発現誘導を受けるかどうか、まず定量的 PCR を用いて解析した。さらに、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析でも同様の解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒドラジン負荷速度とヒドラジン処理速度の上限

まず、安定して処理可能なヒドラジン濃度の上限を調べた。培地のヒドラジン濃度を 10 mg-N/L から段階的に上昇させ、リアクタに供した。複数の anammox 汚泥のロットで共通して 60 mg-N/L まではヒドラジンを 95% 以上除去できたが、70 mg-N/L では除去率が 50% 以下になるロットがあった。そのため、安定処理可能なヒドラジン濃度の上限は 60 mg-N/L と決定した。

次に、ヒドラジン濃度を 60 mg-N/L に固定し、流速を段階的に増加させた。ヒドラジンの負荷速度が 0.15、0.30、0.45 kg-N/m<sup>3</sup>・day の運転では、それぞれ 1 ヶ月程度ヒドラジン除去率 80% を維持し、安定な処理が可能と考えられた。負荷速度 0.45 kg-N/m<sup>3</sup>・day の運転では、ヒドラジン除去率は運転開始 10 日間は 95% 以上だったが、その後徐々に低下し運転 30 日目には約 82% となった。この間の平均ヒドラジン除去速度は 0.40 kg-N/m<sup>3</sup>・day であった。一方、負荷速度が 0.60 kg-N/m<sup>3</sup>・day の運転では、1 週間程度でヒドラジン除去率が 80% を割り、そのまま運転を継続するとさらに 1 週間後(運転開始 2 週間)には除去率が 30% 程度まで低下した。そのため、ヒドラジン負荷速度と処理速度の上

限はそれぞれ 0.45 kg-N/m<sup>3</sup>・day および 0.40 kg-N/m<sup>3</sup>・day と決定した。

##### (2) ヒドラジン除去の化学量論と代謝系

(1) の実験中の定常状態におけるヒドラジン除去速度に対する窒素ガス生成速度、アンモニア生成速度、硝酸除去速度(図 1)から、ヒドラジン除去の化学量論を  $2\text{N}_2\text{H}_4 + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{N}_2 + \text{NH}_4^+ + 3\text{H}_2\text{O}$  と決定した。

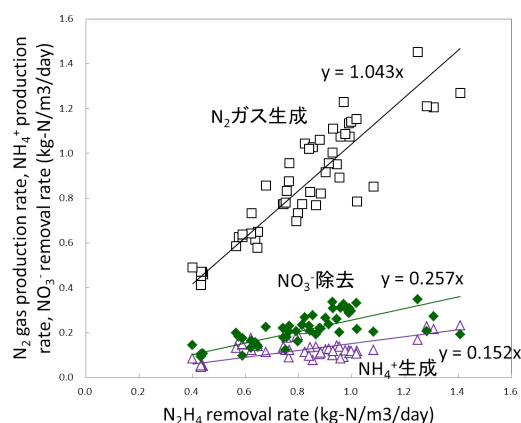


図1. 定常状態でのN<sub>2</sub>H<sub>4</sub>除去速度に対するN<sub>2</sub>ガス生成速度、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>生成速度、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>除去速度の相関

この除去反応に関わる代謝系を明らかにするために、anammox 菌の窒素化合物の代謝に関連する遺伝子について、定量的 PCR を用いて、通常の anammox 培地とヒドラジン添加培地での発現量比較を、anammox 汚泥のロットを変えて複数回実施した。その結果、ヒドラジン添加培地では、ヒドラジン酸化酵素の遺伝子だけでなく、ヒドラジン合成酵素の遺伝子の発現量も増加しており、anammox の代謝系が働いていると考えられた。また、硝酸からアンモニアへの還元機能すると予想していたアンモニア生成型亜硝酸還元酵素の遺伝子の発現が抑制されていたことから、ヒドラジン酸化酵素によるヒドラジンの不均化によりアンモニアが生成されていると考えられた。次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析でも、定量的 PCR 解析結果を支持する結果が

得られたことから、ヒドラジン除去の代謝系は以下の 4 反応で構成されると推察された。

( 反応 1 :  $\text{NO}_3^-$  の  $\text{NO}$  への還元 )  $2\text{NO}_3^- + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow 2\text{NO} + 4\text{H}_2\text{O}$ 、( 反応 2 :  $\text{N}_2\text{H}_4$  合成 )  $2\text{NH}_4^+ + 2\text{NO} + 4\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow 2\text{N}_2\text{H}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ 、( 反応 3 :  $\text{N}_2\text{H}_4$  酸化 )  $3\text{N}_2\text{H}_4 \rightarrow 3\text{N}_2 + 12\text{H}^+ + 12\text{e}^-$ 、( 反応 4 :  $\text{N}_2\text{H}_4$  不均化 )  $3\text{N}_2\text{H}_4 + 4\text{H}^+ \rightarrow 4\text{NH}_4^+ + \text{N}_2$ 。これら反応式の合算は、上記ヒドラジン除去の化学量論と一致した。

## 5 . 主な発表論文等

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

西山 孝、古川 憲治、藤井 隆夫、Anammox 菌による外来ヒドラジンの代謝、日本農芸化学会 2018 年度大会 ( 2018 年 3 月 )

西山 孝、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 菌による培地中のヒドラジンの代謝、第 51 回日本水環境学会年会 ( 2017 年 3 月 )

西山 孝、古川 憲治、藤井 隆夫、anammox 汚泥による人工ヒドラジン排水処理の分子機構の解明、第 23 回日本生物工学会九州支部大会 ( 2016 年 12 月 )

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.life.sojo-u.ac.jp/environ/>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西山 孝 ( NISHIYAMA, Takashi )  
崇城大学・応用生命科学科・准教授  
研究者番号 : 00425331