

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19866

研究課題名（和文）海洋性アナモックス細菌が実現する立地を選ばない閉鎖循環式陸上養殖システムの開発

研究課題名（英文）Marine anammox bacteria: a new alternative filtering technology for the sustainable development of land-based recirculating aquaculture systems

研究代表者

金田一 智規（Kindaichi, Tomonori）

広島大学・先進理工系科学研究科（工）・教授

研究者番号：10379901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：閉鎖循環式陸上養殖の飼育水を処理するためには、海洋性アナモックス細菌のバイオマス確保が重要となるが、海洋性アナモックス細菌の培養条件は最適化されていない。そこで培地成分として添加している微量金属元素とリンに着目してアナモックス活性に与える影響を検討した。微量金属元素に関しては、培養に用いる人工海水に含まれる金属元素で十分なアナモックス活性を示した。リンについてはリン濃度を3段階変化させて比較を行ったところ、3系列ともにアナモックス活性に差はなかった。これらの結果から、これまでに培地成分として添加していた微量金属やリンの量を減らしても海洋性アナモックス細菌の活性の維持には問題ないと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は陸上養殖のデメリットであった排水処理コストの50%を削減し、海水交換頻度を1/10まで低減でき、窒素除去施設の面積を半分にできる、海水へアクセスしにくい内陸部での養殖が可能になるなど、これまでの閉鎖循環式陸上養殖の概念（構成要素・イメージ）を大きく変革させ、環境工学と水産学が融合した次世代型の陸上養殖システムの構築が可能となる。既にヨーテボリ大学養殖研究センターと連携体制にあり、各種海水魚養殖の実飼育水の入手が可能であり、コマーシャルベースでの普及への壁はない。国内では山間部においても陸上養殖が試みられており、海洋性アナモックス細菌による除去法を適用できる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：Although it is important to obtain biomass of marine anammox bacteria to treat wastewater from recirculated land-based aquaculture systems, the culture conditions of marine anammox bacteria have not been optimized. Therefore, we focused on trace metal elements and phosphorus, which are added as culture medium components, and examined their effects on anammox activity. As for trace metal elements, the metal elements contained in the artificial seawater used for culture were sufficient for anammox activity. For phosphorus, a comparison was made by changing the phosphorus concentration in three levels, and there was no difference in anammox activity among the three conditions. These results suggest that reducing the amounts of trace metals and phosphorus that have been added as culture medium components in the past might be possible for maintaining the activity of marine anammox bacteria.

研究分野：排水処理工学

キーワード：海洋性アナモックス細菌 閉鎖循環式陸上養殖 窒素除去

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界人口の増加により持続可能な食料生産技術の開発が求められている。魚介類は栄養価が高く、宗教上の理由、健康志向の高まり等のため需要が増えているが、天然水産資源はほぼ利用され尽くしており、持続可能な方法として養殖を普及させることで魚介類の需要を満たす必要がある。養殖は海面養殖と陸上養殖に大別される。海面養殖は穏やかな内湾で行われ、餌の過剰投与や過密養殖により周辺海域の富栄養化や水質汚染を引き起こすことがある。また、海面養殖に適した海域では既に世界的に養殖が実施されており、これ以上の増加は見込めない。陸上養殖は掛け流し式陸上養殖と閉鎖循環式陸上養殖に分けられる。掛け流し式陸上養殖では、設置が沿岸域に限定されるが、必要な設備は少なく導入しやすい。水槽で使用した飼育水はそのまま放流されるため環境負荷となる。一方、閉鎖循環式陸上養殖では、基本的に飼育水を排出しない方式であるため立地を選ばない。また、飼育環境の人為的管理が可能、疾病感染リスクが小さい、給餌条件などのトレーサビリティの確保等のメリットを有するが、飼育水の循環使用に必要な設備が多く、維持管理コストが普及の妨げとなっている。特に多くの閉鎖循環式陸上養殖では有毒なアンモニアを酸化する硝化装置は普及しているが、硝化で生成した硝酸を N_2 ガスへ脱窒する装置は普及していない。脱窒に必要な外部添加の有機物が、循環飼育水へ残存しないように制御するのが難しいためである。したがって、脱窒を含む低コストの窒素処理法を確立することが閉鎖循環式陸上養殖の普及への鍵となる。

2. 研究の目的

本研究では、海洋性アナモックス細菌を閉鎖循環式陸上養殖の窒素除去法として導入し、立地を選ばず海水の交換頻度が極めて低い次世代型の閉鎖循環式陸上養殖システムの開発を目的とする。海洋性アナモックス細菌は塩分環境下で活性を有し、有機物の添加が不要な脱窒を行うことができるが、海洋性アナモックス細菌の増殖は遅く、現時点で最適培養条件は確立されていない。そこで培地の最適化に加え、リアクター内で増殖した菌体の流出を防ぐ工夫が必要となる。本研究では不織布を担体とした生物膜リアクターと菌体の完全保持が可能なメンブレンバイオリアクターを用いた海洋性アナモックス細菌の大量培養方法を確立する。

3. 研究の方法

海洋性アナモックス細菌による窒素除去法を閉鎖循環式陸上養殖に導入するためには、次の3つの研究項目を実施する必要がある。

研究項目① 海洋性アナモックス細菌の大量培養方法の確立

閉鎖循環式陸上養殖の飼育水を処理するためには、海洋性アナモックス細菌のバイオマス確保が重要となる。しかしながら、現時点で最適な培養条件でも海洋性アナモックス細菌の倍加時間は4-5日であり、増殖が極めて遅く培養が困難である。したがって、培地の最適化に加え、リアクター内で増殖した菌体の流出を防ぐ工夫が必要となる。そこで当研究室で実績のある不織布を担体とした生物膜リアクターと菌体の完全保持が可能なメンブレンバイオリアクターを用いた海洋性アナモックス細菌の大量培養方法を確立する。既報の培地成分は海洋性アナモックス細菌の増殖に最適化されているとは限らないため、温度、塩分、ミネラル、微量金属元素の種類および濃度を変えて培養を行い、最も海洋性アナモックス細菌が増殖する条件を探索する。増殖は定量PCR法によって確認する。

研究項目② 実飼育水を用いたアナモックス活性試験および前処理方法の検討

実験に用いる陸上養殖の飼育水中には窒素成分以外にも有機物や懸濁物質が含まれることが予想される。そこで、実際の飼育水中にアナモックス活性に必要な基質を添加した活性試験を行い、アナモックス活性の低下度合いを明らかにする。また、懸濁物質除去のための膜分離による前処理の必要性についても検討する。アナモックス活性を維持するために微量金属の添加が必要な場合、魚類への蓄積や毒性・ストレスの有無を把握する必要がある。実飼育水の入手や金属元素の蓄積・毒性の評価は、研究協力体制にあるヨーテボリ大学養殖研究センター(スウェーデン)と連携して行う。

研究項目③ 部分硝化を組み込んだアナモックスリアクターの構築と最適化

閉鎖循環式陸上養殖の飼育水中の窒素成分はアンモニアの形態であり、アナモックス細菌が利用する亜硝酸は含まれていない。そこでアンモニアの約半分を亜硝酸へと酸化する部分硝化プロセスが必要となる。塩分を含まない排水の部分硝化は溶存酸素濃度、温度、pH、遊離アンモニア濃度による制御が提案されているが、海水の部分硝化については全く検討されておらず、本研究で部分硝化に最適な制御因子を探索する必要がある。アンモニア酸化の中間化合物であるヒドロキシルアミンを少量添加することで部分硝化が達成できる可能性が高いため、制御因子の一つとして検討を行う。最終的には、部分硝化+アナモックスリアクターを構築し、パイロットスケール構築のための必要設計諸元(温度、pH、滞留時間、アンモニア酸化速度等)を決定する。

4. 研究成果

まず、既報の培地成分として添加している微量金属元素に着目し、それらの種類および濃度を変えて培養を行い、海洋性アナモックス細菌の活性に及ぼす影響を検討した。シーライフ中の微量金属元素のみで海洋性アナモックス細菌の活性が低下するかどうか（図1のRun2）を検討した。その際、微量金属元素ができるだけ含まれない海水を作製するために高純度試薬を用いて海水を合成した実験系（Run3）も構築し、シーライフに微量金属元素を添加した対照系（Run1）と3つの実験系を比較した。その結果、図1に示すように3つのRunの条件が異なるphase2以降で、いずれの実験系においても海洋性アナモックス細菌の活性に差は見られなかった。また、図2に示すように16S rRNA遺伝子に基づく細菌叢解析を行った結果、海洋性アナモックス細菌の構成比は変化しないことがわかった。

	Phase 1	2	3	4
Loading	30mg/L (Q=2mL/min,3mL/min)	30mg/L (Q=2mL/min)	30mg/L (Q=3mL/min)	50mg/L (Q=3mL/min)
Run1	SEALIFE+TE I,II	SEALIFE+TE I,II	SEALIFE+TE I,II	SEALIFE+TE I,II
Run2	SEALIFE+TE I,II	SEALIFE	SEALIFE	SEALIFE
Run3	SEALIFE+TE I,II	Chemical	Chemical	Chemical

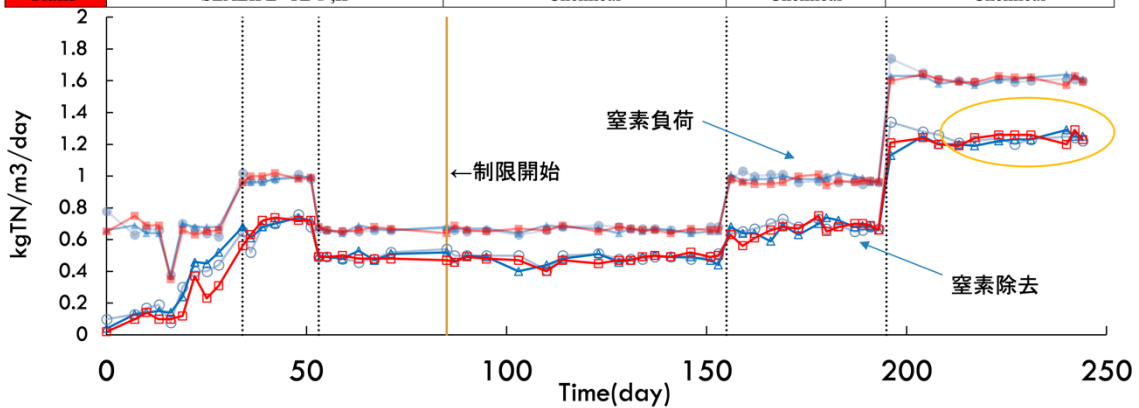


図1 微量金属元素の影響

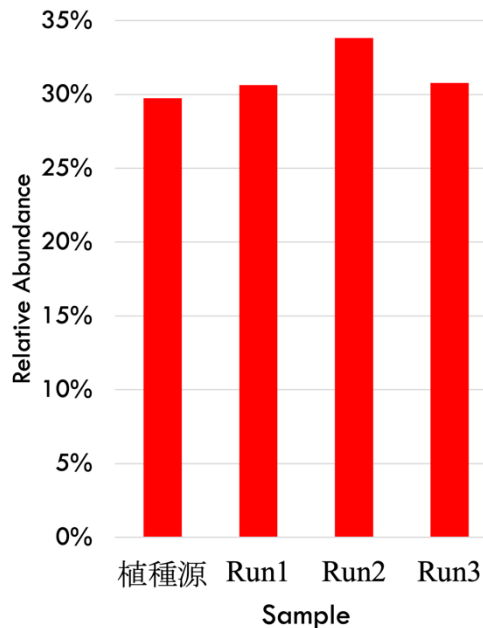


図2 細菌叢解析の結果

次に海水成分以外に培地へ添加しているミネラル分としてリンに着目し、実験を行った。リンを 6.15 mg-P/L 添加した系（対照系 Run4）とリンを 2.27 (Run5) および 1.135 mgP/L (Run6) とした 3 系列で窒素除去性能の比較を行った。また、流出水の海洋性アナモックス細菌の菌体数を定量 PCR 法により調査した。図3に示すように 70 日間の運転では、3 系列ともにアナモックス活性に差はなかった。図3の45日目で3系列ともに窒素除去速度が低下しているのは、流入のpH調整の不具合によるものであった。pHを再調整後、3系列の窒素除去速度はすぐに回復した。また、流出水中の菌体数にも違いがなかった。これらの結果より、少なくとも70日間は、流入水中のリン濃度は1.135 mgP/Lでも海洋性アナモックス細菌の活性や増殖に問題ないことが示唆された。

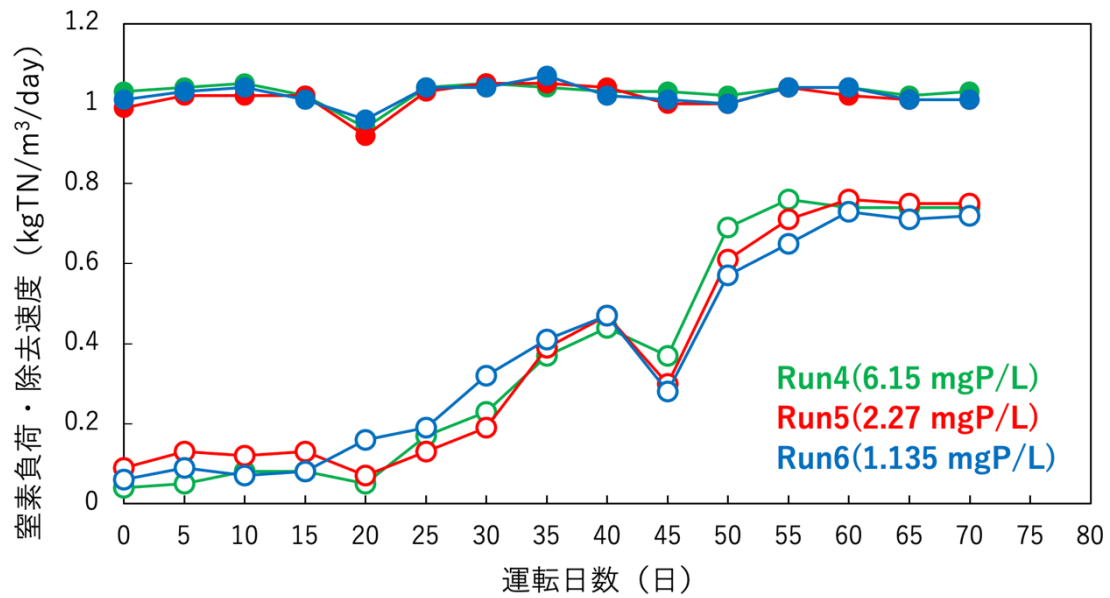


図3 リン濃度の影響

助成期間全体を通して、海洋性アナモックス細菌の大量培養に向けた培地成分の最適化を図ることができた。今後は、本研究で最適化した培地によって海洋性アナモックス細菌のバイオマスを確保し、陸上養殖の実飼育水を用いた活性試験および前処理として海水条件の部分硝化プロセスの確立を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Micolucci Federico, Roques Jonathan A. C., Ziccardi Geoffrey S., Fujii Naoki, Sundell Kristina, Kindaichi Tomonori	4. 巻 11
2. 論文標題 Candidatus Scalindua, a Biological Solution to Treat Saline Recirculating Aquaculture System Wastewater	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Processes	6. 最初と最後の頁 690 ~ 690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pr11030690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 康平, Tharangani Nawarathana, 藤井 直樹, 金田一 智規
2. 発表標題 アナモックス細菌の増殖速度を増加させる化合物の特定
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会 L-67
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------