

資 料

ANAMMOX菌による環境浄化の基礎研究（3）

ー上向流式リアクターによるANAMMOX菌集積培養の試みー

永田 善明*・田島 政弘*・塩村 隆信*

1. 目 的

ANAMMOX菌とは、嫌気条件下でアンモニアを亜硝酸で酸化することにより、エネルギーを得ている独立栄養生物である。排水からの窒素除去にANAMMOX菌を用いた場合、硝化の際に部分的亜硝酸化でよいため曝気量が少なくすむこと、脱窒に有機物が不要であることなど、従来型の硝化脱窒法と比較して処理費用の大幅な削減が期待できる¹⁾。

ANAMMOX菌を実排水の処理に適用するためには、あらかじめ菌体を集積培養する必要がある。これに対して、ANAMMOX菌をメタン菌グラニュール表面に増殖させる方法²⁾、担体に固定化する方法^{3, 4)}によって集積し、パイロットスケールでの実排水処理に適用した例が報告されている。しかし、ANAMMOX菌は未だ単離培養されておらず、その性質についてはほとんど知見が得られていないこと、倍加時間が11日と極めて増殖が遅く、酸素によって強く阻害されること⁵⁾などにより、菌体の集積には長期間の培養と培地組成の工夫が必要となる。

筆者らはANAMMOX菌による排水処理の可能性を探るため、ANAMMOX菌による脱窒処理に適した環境を備えている鳥根県内のK浄化センター（下水処理施設）の生物脱臭槽に着目し、菌相解析によりこの脱臭槽内の微生物環境を明らかにした⁶⁾。また、この生物脱臭槽内の汚泥と循環水を用いてANAMMOX菌の集積培養を試みた。しかし、集積培養に用いたリアクター内にANAMMOX菌の存在を確認することはできたが、最終的にANAMMOX活性を得ることはできなかった⁷⁾。その理由としては、培地中の微量元素の不足によるANAMMOX菌の増殖不良や、リアクターを循環式にしたことによる菌体の系外への流出が考えられた。そこでこれらの点を改善し、再度集積培養を行った結果、ANAMMOX活性を得られたので報告する。

2. 方 法

ANAMMOX菌の集積培養は、上向流式リアクターを用いた連続培養法⁸⁾により行った。図1にリアクターの模

式図を示す。リアクターの汚泥保持部には、内径32mm、長さ250mmの亚克力樹脂製パイプを用い、両端をプチルゴム栓で閉じた。また、外部をラバーヒーターで覆い、水温が35℃となるよう調節した。配管には、気体透過性が低いとされるTIGON R-3603チューブ（サンゴバン・ノートン製）を用い、外部から酸素が透過しないよう注意した。

リアクター内に充填する生物担体には、ポリビニルアルコール（以下PVAと称す）球体⁹⁾またはPVAスポンジを用いた。種汚泥には、K浄化センターより採取した余剰汚泥を用い、蒸留水で2倍に希釈した後、生物担体を浸漬して汚泥を保持させた。

培地は文献^{10)~12)}を参考に表1に示す組成とした。表中の下段に示すのが今回培地に添加した微量元素である。培地は窒素ガス曝気によって予め脱酸素したものを、チューブポンプを用いて1L/日で送液した。ANAMMOX活性の評価は、培地中のアンモニウムイオン、亜硝酸イオン、硝酸イオン濃度をイオンクロマトグラフ法で測定することにより行った。

ANAMMOXリアクターのスケールアップには、内径65mm、長さ330mmの亚克力樹脂製円筒を用い、外部をラバーヒーターで覆って水温が35℃となるよう調整した。また、生物担体として、内部に短冊状のPVAスポンジ（200mm×10mm×2mm）を充填した。

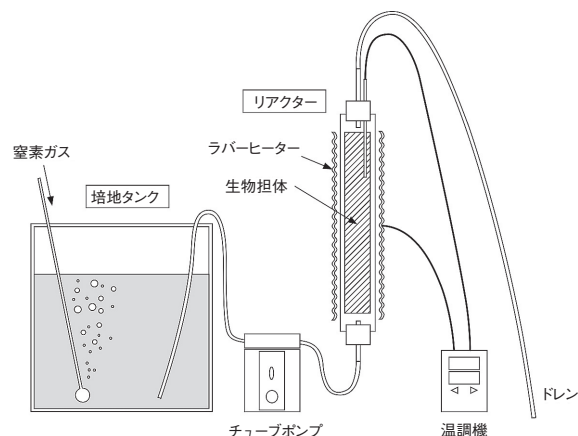


図1 上向流式リアクターの模式図

*環境技術グループ

表1 培地の組成

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	70.7mg/L
NaNO_2	148mg/L
NaH_2PO_4	78.0mg/L
KH_2PO_4	68.1mg/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24.7mg/L
CaCl_2	22.2mg/L
KHCO_3	100mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.6 $\mu\text{g/L}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	29.7 $\mu\text{g/L}$
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39.6 $\mu\text{g/L}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25.0 $\mu\text{g/L}$
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24.2 $\mu\text{g/L}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	29.7 $\mu\text{g/L}$
H_3BO_4	618.3 $\mu\text{g/L}$

3. 結果および考察

3.1 上向流式リアクターによるANAMMOX菌の集積培養

既報⁷⁾ではリアクターに充填する生物担体としてポリエステル綿を用いたが、無機培地による培養では汚泥生成量が低いため、ポリエステル綿では汚泥を十分に保持できないことがあきらかとなった。よって、本培養ではより汚泥保持能力に優れたPVA球体、PVAスポンジを生物担体に用いた。集積培養はPVA球体充填リアクター2本、PVAスポンジ充填リアクター2本の計4本で行った。このうち、PVAスポンジ充填リアクターの1本において、ANAMMOX活性を得ることができた。図2に、ANAMMOX活性が得られたリアクターにおけるアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素および全窒素の除去量の経時変化を示す。なお、負で示される値は、その成分が生成していることを表している。培養開始直後は、15-20mgN/日程度の比較的強い亜硝酸除去活性が見られたが、これは、種汚泥中の有機物を水素供与体とする通常の脱窒反応と思われる。この脱窒活性は培養時間が経過するにつれて徐々に低下し、培養開始後約60日を経過すると、脱窒活性は2-5mgN/日ではほぼ一定となった。さらに培養を継続したところ、培養開始後224日目にANAMMOX活性と思われるアンモニアと亜硝酸の除去量の増加および硝酸の生成を確認した。その後、徐々にアンモニアと亜硝酸の除去量が増加し、アンモニアと亜硝酸の同時除去が30日間継続した時点でANAMMOX活性を得たと判断した。

培養開始後約330日後には、全窒素除去量は14.5mgN/日となり、この時のアンモニア態窒素除去量に対する亜硝酸態窒素除去量と硝酸態窒素生成量の比は1:2.56:1.03であった。ANAMMOX菌による脱窒の窒素収支の比率は実験式から1:1.32:0.26と報告されており^{13, 14)}、これと比較した場合、このリアクターでは亜硝酸除去量と硝酸生成量が大きかった。これは、ANAMMOX活性がまだ低

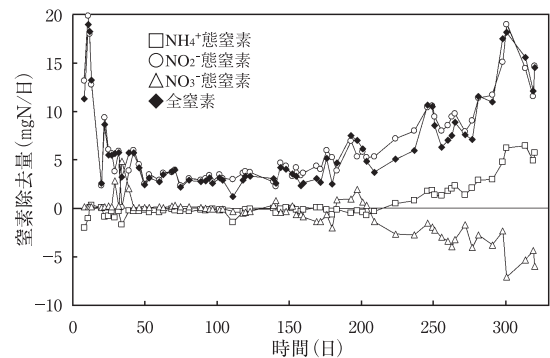


図2 ANAMMOX活性が得られたリアクターにおける形態別窒素除去量の経時変化

く、リアクター内に生息している脱窒菌の内性呼吸や硝酸菌による硝化の影響が無視できないためと考えられる。なお、本培養では培地をリアクターに供給する前に窒素ガス曝気による脱酸素を行っているが、酸化還元電位は約370-420mVと微好気条件であり、硝化はこのわずかに残る酸素によって起こると考えられる。

3.2 ANAMMOXリアクターのスケールアップ

培養開始後239日目に、ANAMMOX活性が得られたリアクターの後段に新規リアクターを連結し、流出するANAMMOX菌によるリアクターのスケールアップを行った。新規リアクターの外観を図3に、また窒素除去量の経時変化を図4に示す。新規リアクターによるANAMMOX活性の出現は、種汚泥からの集積培養に比較して早く、リアクター連結後80日目にANAMMOX活性を確認した。また178日目の全窒素除去量は17.8mgN/日に達し、この時のアンモニア態窒素除去量に対する亜硝酸態窒素除去量と硝酸態窒素生成量の比は1:1.69:0.09であった。この値は3.1項のリアクターと比較して実験式の比率により近い値であった。その理由として、より高いANAMMOX活性が得られたために脱窒菌の内性呼吸や硝酸菌による硝化の影

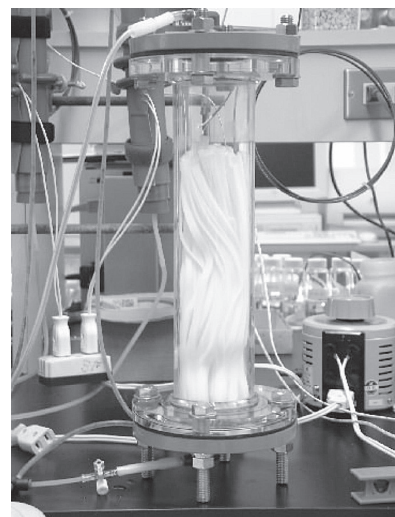


図3 スケールアップに用いた新規リアクターの外観

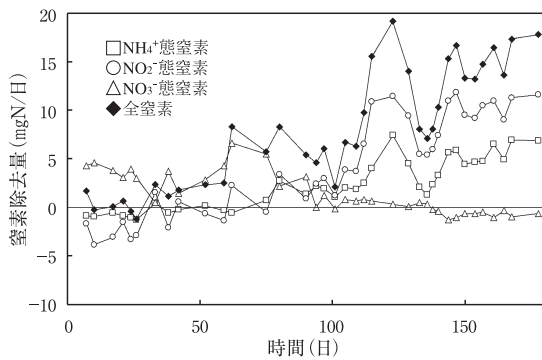


図4 新規リアクターにおける形態別窒素除去量の経時変化

響が相対的に小さくなったことが考えられる。このように、リアクターにANAMMOX活性が得られれば、そこから流出する菌体によってスケールアップが速やかに行えることが分かった。

リアクターのスケールアップ実験は現在も継続中であり、今後さらに活性が上昇すると期待される。ANAMMOX菌による脱窒処理を実排水に適用するためには、菌体の集積による高い脱窒活性が必要となる。すでに報告されている250Lスケールのパイロットプラント実験¹⁵⁾では、単位スケール当たり本報告の約250倍の脱窒能力を達成しており、今後のスケールアップの目標となる。また、今回のスケールアップではANAMMOX活性の出現まで80日を要しているが、ANAMMOX菌の増殖速度は従来言われているよりも速く、倍加時間は1.8日という報告もある¹⁶⁾。これは、ANAMMOX菌の集積培養条件が現時点ではまだ最適化されていないことを示しており、実用化に当たって迅速なリアクターの立ち上げを行うための重要な課題と言える。

文 献

1) 古川憲治, 嫌気性アンモニア酸化 (anammox) の発見とその

- 後の研究開発動向, 水環境学会誌, 27, 442-447 (2004)
- 2) 古川憲治, 徳富孝明, 今城麗, 清川智弘, ANAMMOX微生物を利用した新規窒素除去プロセスの実証運転, 第40回下水道研究発表会講演集, 817-819 (2003)
- 3) 山口明, 荒川清美, 田中俊博, 実排水を用いたアンモニア脱窒法の検討, 第38回日本水環境学会年会講演集, 371 (2004)
- 4) 高木啓太, 篠田高明, 山本太一, 古川憲治, 家畜ふん尿メタン発酵脱離液を対象としたアナモックス処理法の検討, 第40回日本水環境学会年会講演集, 167 (2006)
- 5) Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J. G., Jetten, M., Effects of Aerobic and Microaerobic Conditions on Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Sludge, Appl. Environ. Microbiol., 63, 2446-2448 (2000)
- 6) 永田善明, 田島政弘, 塩村隆信, ANAMMOX菌による環境浄化の基礎研究 (1), 鳥根県産業技術センター研究報告, 41, 5-9 (2004)
- 7) 永田善明, 田島政弘, 塩村隆信, ANAMMOX菌による環境浄化の基礎研究 (2) 循環式リアクター内に生息するANAMMOX菌の遺伝子解析, 鳥根県産業技術センター研究報告, 43, 4-7 (2006)
- 8) 生田創, 井坂和一, 角野立夫, 連続培養系による嫌気性アンモニア酸化細菌の馴養, 第38回日本水環境学会年会講演集, 372 (2004)
- 9) 吉田憲治, Rouse, J. D., 今城麗, 古川憲治, 嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 汚泥の調整に関する研究, 土木学会年次学術講演会講演概要集, 323-333 (2001)
- 10) Kuai, L., Verstraete, W., Ammonium Removal by the Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification System, Appl. Environ. Microbiol., 64, 4500-4506 (1998)
- 11) 小林猛, 佐藤一博, 培養の基本操作と培養装置, 微生物利用の大展開, 東京, エヌ・ティー・エス, 2002, 534-538
- 12) 今城麗, 安井秀齊, 石田浩昭, 藤井隆夫, 杉野浩幸, 古川憲治, 活性汚泥からのANAMMOX微生物の集積培養, 水環境学会誌, 27, 413-418 (2004)
- 13) Van de Graaf, A. A., De Bruijn, P., Rovertson, L. A., Jetten, M. S. M., Kuenen, J. G., Metabolic Pathway of Anaerobic Oxidation on the Basis of 15N Studies in a Fluidized Bed Reactor, Microbiology, 143, 2415-2421 (1997)
- 14) Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M., The Sequencing Batch Reactor as a Powerful Tool for the Study of Slowly Growing Anaerobic Ammonium-Oxidizing Microorganisms, Appl. Environ. Microbiol., 50, 589-596 (1998)
- 15) 徳富孝明, anammoxプロセス実用化の展望, 水環境学会誌, 27, 453-457 (2004)
- 16) 井坂和一, 角野立夫, 伊藤康博, 吉江幸子, 常田聡, 稲森悠平, 連続処理系における嫌気性アンモニア酸化細菌の増殖特性, 第39回日本水環境学会年会講演集, 326 (2005)