

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

嫌気性アンモニア酸化反応を活用した高効率窒素除去プロセスの開発
Development of advanced nitrogen removal processes using
anaerobic ammonium oxidation

申 請 者

井坂	和一
Kazuichi	Isaka

--

2007 年 12 月

近年、産業廃水や下水等を起因とする水環境汚染が深刻な問題となっている。特に窒素・リン等の栄養塩の流出に伴い、湖沼、内湾等の閉鎖性水域が富栄養化し、有毒アオコの発生といった問題が生じている。これに対し、廃水中の窒素規制は年々強化され、2004年の第5次総量規制に続き、第6次総量規制が予定されている。廃水中の窒素除去技術としては、生物学的処理が有効であるとされ、主に硝化・脱窒法が用いられている。しかしながら、この方法では多大な曝気動力が必要であることや、脱窒工程において多量のメタノール添加が必要であること等から、ランニングコストの増加、さらには余剰汚泥の発生といった問題が生じている。そこで、より低コストで省エネルギー型の新しい廃水処理システムの開発が望まれている。

近年、オランダの研究グループによって、嫌気性アンモニア酸化反応（以下、アナモックス反応：anaerobic ammonium oxidation）を行う微生物が発見された。アナモックス反応は、アンモニアと亜硝酸を利用して窒素ガスへと変換する生物化学反応であり、この反応を廃水処理に利用できれば従来必要とされたメタノール添加が不要となる。また、約半量のアンモニアはそのまま脱窒されるため、硝化のための曝気動力も大幅に削減でき、実用化できれば大きなメリットが期待される。しかしながら、この反応を担う微生物（アナモックス菌）は、その培養および固定化技術が確立されていないことから、廃水処理への適用が難しい技術とされていた。また、アナモックス菌の外部環境に対する感受性、すなわち低水温、pH、有機物質の影響等、基礎的知見が少ないことから、その適用対象が水温の高い発酵廃水等に限定されていた。さらに、アナモックス反応では、アンモニアと同時に亜硝酸の供給が必須であり、廃水中のアンモニアを亜硝酸に酸化する亜硝酸型硝化プロセスを同時に開発する必要がある。

上記の点を鑑み、本研究では、数種類の汚泥からアナモックス菌を集積培養する技術およびアナモックス菌を高分子ゲルで包括固定化する技術について検討し、この担体を用いた廃水処理システムの開発を行った。さらに、アナモックス菌の外部環境に対する感受性を解明し、その適用範囲の拡大について検討を行うと同時に、アンモニアを亜硝酸に酸化する亜硝酸型硝化プロセスの開発を行った。

本章は、9章より構成されている。以下に各章の概要を述べる。

第1章では、生物学的窒素除去プロセスに関する既往研究を整理し、それに対してアナモックス反応を利用するメリットおよび課題をまとめ、本研究の目的と意義を述べた。

第2章では、廃水中のアンモニアを亜硝酸に酸化する亜硝酸型硝化プロセスの開発について検討した。担体としては硝化菌を包括固定化した担体を用いた。従来法では、アンモニアは亜硝酸を経由し、硝酸まで酸化されてしまうことから、亜硝酸酸化反応を阻害する方法について検討を行った結果、60℃の水温で1時間以上担体を加熱処理することにより、担体内の亜硝酸酸化細菌を不活化できるこ

とを明らかにした。同時に、アンモニア酸化細菌は、高温条件下でも活性を維持できることを確認した。さらにこの加熱担体を用いた連続処理試験を行い、担体を連続的に少量ずつ加熱処理することで亜硝酸型の硝化性能を6ヶ月以上維持できることを明らかにした。

第3章では、アナモックス菌の培養について検討を行った。不織布を固定床とした連続培養法を開発し、異なる3種類の汚泥からアナモックス菌の集積培養を試みた。その結果、いずれの培養系においてもアナモックス活性が得られ、滞留時間を徐々に短縮するとによってアナモックス菌の集積培養に成功した。16S rRNA 解析の結果、下水汚泥から得られたアナモックス汚泥中には、既に報告されているアナモックス菌 (*Candidatus Brocadia anammoxidans*) とは遺伝子配列の相同性が低い菌が検出され、新しいアナモックス菌が集積培養されていることを明らかにした。さらに、亜硝酸濃度を280mg-N/L以下として、短い滞留時間(40min)で運転することで、11.5kg-N/m³/d という極めて高い窒素除去速度が得られることがわかった。このときアナモックス菌の増殖速度を、蛍光遺伝子ハイブリダイゼーション (FISH) 法によるダイレクトカウントで測定した結果、倍加時間は1.8日であり、既報告値(11日)より6倍以上高い増殖活性を有することを明らかにした。

第4章では、アナモックス菌の固定化法について検討した。3mm角のキューブ状のポリエチレングリコールゲル内に、0.24%の菌体濃度でアナモックス菌を包括固定化することに成功した。次に、得られた包括固定化担体を用いて、合成廃水の連続処理試験を行った結果、67日目には3.7 kg-N/m³/d の高い処理性能を得ることができた。このとき FISH 法により、担体内部にアナモックス菌が生息していることを確認した。また、Real-time PCR 法により、担体内におけるアナモックス菌の最大増殖速度を見積もったところ、倍加時間4.3日という値が得られた。

第5章では、アナモックス菌の有機物質に対する感受性について評価した。アナモックス菌はメタノールにより強く阻害されることが明らかとなり、エタノールについても若干の阻害傾向を確認した。一方、イソプロピルアルコール、酢酸、プロピオン酸については、影響が無いことを示した。さらに、メタノールによる阻害効果について詳細に検討した結果、①メタノールはアナモックス菌を直接的に阻害しないこと、②アンモニアと亜硝酸の両基質の存在下においてメタノールを添加すると活性が阻害されること、③メタノールによる阻害は不可逆的であることを解明した。これらの結果から、メタノール以外の有機物質混入はアナモックスプロセスへ強く影響を及ぼさないが、メタノールに関しては適切な管理が必要であることが示され、実廃水処理に向け重要な知見を得ることができた。

第6章では、アナモックス菌の水温、pH に対する感受性について検討した。まず、連続処理系において、アナモックス活性は水温 6℃でも維持可能である結果を得た。さらに回分試験によって、水温と活性の関係について定量的に検討した

結果，①アナモックス菌の至適温度は 37°C であること，②アナモックス反応の活性化エネルギーは 28°C で変化し， $22\sim 28^{\circ}\text{C}$ では 93kJ/mol ， $28\sim 37^{\circ}\text{C}$ では 33kJ/mol であること，③高温（ 45°C ）での活性低下は不可逆的であることを明らかにした。これらの結果は，低水温下におけるアナモックスプロセスの実用性を示し，適用廃水の拡大が図れることを明らかにした。さらに pH がアナモックス活性へ及ぼす影響を評価した結果，弱アルカリ性（ $\text{pH}=8.6$ ），弱酸性（ $\text{pH}=6.2$ ）において活性の低下が確認された。この要因について検討した結果，アルカリ条件下では，アンモニウムイオンから遊離した遊離アンモニアにより，酸性条件下では亜硝酸イオンから遊離した遊離亜硝酸により，それぞれアナモックス活性が阻害されることを明らかにした。これらの結果から，アナモックスプロセスでは，許容される pH 範囲が比較的狭いことが明らかとなり，プロセスの安定化において基礎的かつ重要な知見を得ることができた。

第7章では，本研究で開発したシステムについて，実廃水への適用性を明らかにするため，消化汚泥脱水ろ液（平均アンモニア濃度 990mgN/L ）の処理について検討した。まず，亜硝酸型硝化プロセスについて，反応容積 10L 規模のベンチスケール試験を行った結果，加熱処理した担体の利用により，亜硝酸型硝化を6ヶ月以上維持できることを明らかにした。さらに，包括固定化アナモックス担体を用いて硝化处理水を処理したところ，平均窒素除去速度 $4.0\text{kg-N/m}^3/\text{d}$ という高い窒素除去性能を確認した。実廃水中に含まれる有機物質や懸濁物質による阻害は確認されず，本法が実廃水に適用できる見通しを得た。

第8章では，アナモックス反応のさらなる応用展開として，硝酸，アンモニアおよび有機物質を基質とした硝酸還元型アナモックスプロセスについて基礎的な検討を行った。これは，硝酸を脱窒菌により還元させ，生成した亜硝酸とアンモニアによりアナモックス反応を行う方法である。脱窒菌が付着したメタングラニュールとアナモックス菌が付着した不織布を同一反応槽に投入し，廃水处理試験を行った結果，硝酸とアンモニアの同時除去を確認した。また，硝酸還元のための有機物質濃度比（C/N 比）が窒素除去性能に大きく影響することが明らかとなり，C/N 比 0.89 の条件で最大 97% の窒素除去性能を得ることができた。

第9章では，本論文の総括および展望を述べた。

以上，本論文で示したアナモックス反応を用いた窒素除去プロセスは，従来の硝化・脱窒プロセスで課題となっていた，酸素供給量および薬剤添加量を大幅に削減できる可能性を有している。本研究では，包括固定化法を活用したアナモックス菌の固定化技術および加熱担体を用いた亜硝酸型硝化プロセスの開発を行うと同時に，アナモックス菌の生理学的特性について重要な知見を得ることができた。これらの研究成果は新しい窒素除去プロセスの開発のみならず，環境浄化技術および環境生物工学の発展に大いに寄与することが期待される。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏 名 井坂 和一 印

(2007年11月 現在)

種 類 別	題名, 発表・発行掲載誌名, 発表・発行年月, 連名者 (申請者含む)
論文	<p>(1) (報文) <u>K. Isaka</u>, Y. Kimura, T. Sumino, S. Tsuneda Nitrogen removal performance using anaerobic ammonium oxidation at low temperatures. FEMS Microbiology Letters, (投稿中) .</p> <p>(2) (報文) <u>K. Isaka</u>, T. Sumino, S. Tsuneda Novel nitrification process using heat-shocked nitrifying bacteria entrapped in gel carrier. Process Biochemistry, (投稿中)</p> <p>(3) (報文) <u>K. Isaka</u>, Y. Date, T. Sumino, S. Tsuneda Ammonium removal performance of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier. Applied Microbiology and Biotechnology, <i>In press</i></p> <p>(4) (報文) <u>K. Isaka</u>, T. Sumino, S. Yoshi, Y. Inamori S. Tsuneda Nitrification of landfill leachate using immobilized nitrifying bacteria at low temperatures Biochemical Engineering Journal, 37, 49-55 (2007)</p> <p>(5) (報文) T. Yokoi, Y. Kaku, H. Suzuki, H. Ikuta, <u>K. Isaka</u>, T. Sumino, M. Wagatsuma 'FloraArray' for screening of specific DNA probes representing the characteristic of a certain microbial community. FEMS Microbiology Letters, 273, 166-171 (2007)</p> <p>(6) (報文) <u>K. Isaka</u>, T. Sumino, S. Tsuneda High nitrogen removal performance at moderately low temperature utilizing anaerobic ammonium oxidation reactions. Journal of Bioscience and Bioengineering, 103, 486-490 (2007)</p> <p>(7) (報文) T. Sumino, <u>K. Isaka</u>, H. Ikuta, Y. Saiki, T. Yokota Nitrogen removal from wastewater using simultaneous nitrate reduction and anaerobic ammonium oxidation in single reactor. Journal of Bioscience and Bioengineering, 102, 346-351 (2006).</p> <p>(8) (報文) <u>K. Isaka</u>, Y. Date, T. Sumino, S. Yoshie, S. Tsuneda Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in an anaerobic biological filtrated (ABF) reactor. Applied Microbiology and Biotechnology, 70, 47-52 (2006)</p>
総説	<p>(1) <u>井坂和一</u> 嫌気性アンモニア酸化法の有効性と実用化に向けた課題と対策 水環境学会誌, 27 (7), 458-462 (2004)</p> <p>(2) 稲森悠平, <u>井坂和一</u>, 鈴木智, 須藤隆一 廃棄物埋立地浸出水等に含有される微量化学物質ジベンゾフラン, 1,4-ジオキサンなどの高度処理 用水と廃水, 41 (1), 48-54 (1999)</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名, 発表・発行掲載誌名, 発表・発行年月, 連名者（申請者含む）
講演 (国際会議)	<p>(1) <u>K. Isaka</u>, Y. Kimura, T. Sumino, S. Tsuneda Nitrogen removal performance utilizing anaerobic ammonium oxidation at low temperatures 2nd IWA - ASPIRE Conference and Exhibition, Perth, Australia, 28 (October, 2007)</p> <p>(2) Y. Date, <u>K. Isaka</u>, T. Sumino, S. Tsuneda, Y. Inamori Microbial community of anammox bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier 2nd IWA - ASPIRE Conference and Exhibition, Perth, Australia, 28 (October, 2007)</p> <p>(3) Y. Date, S. Yoshie, S. Tsuneda, <u>K. Isaka</u>, T. Sumino, Y. Inamori Microbial community and growth characteristic of bacteria exhibiting a high anaerobic ammonium oxidation activity International Symposium on Environmental Biotechnology Leipzig Leipzig, Germany, (July, 2006)</p> <p>(4) Y. Date, S. Yoshie, S. Tsuneda, <u>K. Isaka</u>, T. Sumino, Y. Inamori Microbial community analysis of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in a continuous-feeding cultivation system 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference, Gold coast, Australia, (July, 2005)</p> <p>(5) <u>K. Isaka</u>, H. Ikuta, T. Sumino, Y. Date, S. Yoshi, S. Tsuneda Enrichment of Anaerobic Ammonium Oxidizing (ANAMMOX) Bacteria from Activated Sludge Using Continuous Cultivation System. 78th WEFTEC, Washington DC, USA (October, 2005)</p>
講演 (国内)	<p>(1) <u>井坂和一</u>, 木村裕哉, 角野立夫, 常田聡 アナモックス菌の外部環境に対する感受性 第10回日本水環境学会シンポジウム, 熊本 (2007年9月発表)</p> <p>(2) <u>井坂和一</u>, 生田創, 角野立夫 包括固定化アナモックス担体を用いた汚泥脱水ろ液中の窒素除去特性 第44回下水道研究発表会, 東京 (2007年7月発表)</p> <p>(3) <u>井坂和一</u>, 生田創, 角野立夫, 能登一彦 包括固定化アナモックス担体による汚泥脱離液の処理特性 第41回日本水環境学会年会, 大阪 (2007年3月発表)</p> <p>(4) <u>井坂和一</u> 嫌気性アンモニア酸化細菌 (anammox) を用いた窒素除去技術 (株)技術情報センター主催「～低コストでできる～排水の窒素規制対策」, 東京 (2006年12月講演)</p> <p>(5) <u>井坂和一</u>, 生田創, 角野立夫, 常田聡 低水温が及ぼす嫌気性アンモニア酸化活性への影響 日本水処理生物学会第44回大会, 仙台 (2006年11月発表)</p> <p>(6) <u>井坂和一</u>, 生田創, 角野立夫, 常田聡, 稲森悠平 嫌気性アンモニア酸化法による低水温条件下における窒素除去特性 第9回日本水環境学会シンポジウム, 東京 (2006年9月発表)</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名, 発表・発行掲載誌名, 発表・発行年月, 連名者（申請者含む）
	(7)井坂和一, 生田創, 角野立夫, 伊達康博, 常田聡 嫌気性アンモニア酸化反応への共存有機物質の影響 第40回日本水環境学会年会, 仙台 (2006年3月発表)
	(8)井坂和一, 角野立夫, 伊達康博, 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, 千葉 (2005年3月発表)
	(9)井坂和一, 角野立夫, 吉江幸子, 常田聡, 稲森悠平 嫌気性アンモニア酸化反応系における亜硝酸酸化反応の発見 第39回日本水環境学会年会, 千葉 (2005年3月発表)
	(10)井坂和一 包括固定化法を用いた嫌気性アンモニア酸化細菌の固定化と廃水処理システムの開発事例 (株)技術情報センター主催「嫌気性アンモニア酸化法(anammox)を活用した排水処理技術」, 東京 (2005年3月講演)
	(11)井坂和一, 角野立夫, 吉江幸子, 常田聡, 稲森悠平 嫌気性アンモニア酸化反応を利用した高速窒素除去技術 第7回日本水環境学会シンポジウム, 東京 (2004年9月発表)
	(12)井坂和一, 生田創, 角野立夫 嫌気性アンモニア酸化法を活用した高効率窒素除去プロセスの検討 第41回下水道研究発表会, 横浜 (2004年7月発表)
	(13)井坂和一, 生田創, 角野立夫 加熱処理包括固定化担体による完全亜硝酸型硝化プロセスの検討 第38回日本水環境学会年会, 札幌 (2004年3月発表)
	(14)井坂和一, 生田創, 角野立夫 加熱処理包括固定化法による完全亜硝酸型硝化プロセスの検討 第37回日本水環境学会年会, 熊本 (2003年3月発表)
	他 5 件
	(国内特許) (1)井坂和一, 角野立夫:嫌気性アンモニア酸化槽の運転方法及び嫌気性アンモニア酸化装置, 特許第 3894329 号 (2)井坂和一, 角野立夫:菌体回収方法, 装置及び馴養方法並びに廃水処理装置, 特許第 3968589 号 (3)井坂和一, 生田創, 角野立夫:窒素除去方法及び装置, 特許第 3968781 号 (4)井坂和一, 角野立夫, 能登一彦:包括固定化担体及びその製造方法, 特開 2007-125460 (5)井坂和一, 角野立夫, 常田聡:嫌気性アンモニア酸化細菌の培養方法及び装置, 特開 2006-246847 他 44 件
その他 (特許)	(海外特許) (1)井坂和一, 角野立夫:窒素除去方法及び装置, 特許第 7,114,508 号 (米国) (2)井坂和一, 角野立夫:亜硝酸型硝化担体及びその製造方法並びにそれを用いた窒素除去方法及び装置 特許第 7,192,765 号 (米国) (3)井坂和一, 角野立夫, 常田聡:嫌気性アンモニア酸化細菌の培養方法および装置 EP1702891A1 (欧州) 他 47 件