

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

Development and microbiological analysis of the biological nutrient removal process combined with sludge reduction and phosphorus recovery system

汚泥減容化工程およびリン回収工程を付加した生物学的栄養塩除去プロセスの開発と微生物生態解析

申 請 者

氏 名

近藤

貴志

Takashi

Kondo

専攻・研究指導
(課程内のみ)

応用化学専攻 化学工学研究

2006 年 12 月

世界各地の湖沼や内湾等の閉鎖性水域は、窒素・リンなどの栄養塩類の蓄積が進行し、アオコ・赤潮の発生などの富栄養化現象が顕在化している。この問題の解決のためには排水中の窒素・リンを取り除く処理、すなわち高度処理の普及が必要不可欠である。高度処理のために広く採用されている生物学的栄養塩除去プロセスにおいては、処理に関与した微生物が最終的に余剰汚泥として廃棄される。我が国において、この余剰汚泥は産業廃棄物の2割を占め、その削減が急務の課題である。また、我が国は枯渇化資源であるリン鉱石を100%輸入に頼っているが、その2割が排水として放流されており、排水あるいは余剰汚泥に含まれるリンを回収することが重要である。一方、栄養塩除去プロセスの性能を大きく左右する微生物の生態を把握することは極めて重要であるが、リン除去を担うリン蓄積細菌群(PAOs)は系統学的な同定も未だ不十分であり、その詳細な生態については不明である。

上記の点を踏まえ、本論文では、余剰汚泥減容・リン回収型の高度処理プロセスの開発を行い、プロセスに存在する微生物の生態について解析することを目的とする。具体的には、余剰汚泥発生を抑制することが可能となる脱窒性リン蓄積細菌(DNPAOs)を活用した嫌気/好気/無酸素(A/O/A)リアクターを用い、微細気泡化オゾン処理を導入することにより余剰汚泥の可溶化を促進し、リンに対して高い選択吸着性をもつジルコニウムフェライト系吸着剤を用い、可溶化したリンを回収するプロセスを開発した。さらに、分子生物学的手法を活用することにより、プロセス内に存在する微生物叢を評価した。また、処理性能に大きな影響を及ぼす微生物の生態に着目し、密度勾配遠心分離法によるスクリーニング技術の開発を行うと共に微生物の基質資化活性を *in situ* に評価する MAR-FISH 法の導入を行った。

本論文は6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、DNPAOsを活用した高度処理プロセス、汚泥減容化技術およびリン回収技術についてまとめ、また、リン蓄積細菌(PAOs)の生態解析について過去の研究動向を整理して、本研究の研究背景をまとめ、意義および目的を述べた。

第2章では、汚泥減容化技術として微細気泡化オゾン処理を導入するための評価を行った後、AOAプロセスにオゾン処理を用いた汚泥減容化工程およびリン回収工程を付加したプロセスを運転し、最適運転条件の探索を行った。通常のアオゾン処理と微細気泡化オゾン処理による汚泥可溶化効果(S-TOC/TOC)および生物分解性(BOD_5/COD_{Mn})を比較した結果、微細気泡化オゾン酸化処理を適用することで、通常のアオゾン処理に比べ単位汚泥量あたり1/10以下のオゾン注入量($51\text{ g-O}_3/\text{kg-MLSS}$)で、高い汚泥可溶化効率および高い生物分解性が得られることを示した。つぎに、実際の農業集落排水を用いた連続運転を行った結果、オゾン

処理を行う汚泥量の変化が、処理性能、特に窒素除去性能に大きく影響を及ぼすことが確認された。これはオゾン処理液および残渣が硝化細菌の活性に影響を及ぼしたのではなく、オゾン処理により微生物が死滅することから、オゾン処理汚泥量が多い条件では汚泥滞留時間（SRT）が短くなり、増殖速度の遅い硝化細菌の個体数密度が減少したためであることを示した。最終的に、オゾン処理汚泥量 8%-total MLSS/day、オゾン濃度 40g-O₃/m³、オゾン注入量 30g-O₃/kg-MLSS の条件において処理性能の安定化を図ることに成功し、本プロセスの有用性を示した。また、各槽の濃度分布から、オゾン処理液に含まれる有機物により好気槽での PAOs によるリン摂取が抑制され、後段の無酸素槽において DNPAOs によるリン摂取および脱窒が活発に行われていることを確認した。この無酸素槽での脱窒反応については、DNPAOs のみならず、他の内生脱窒細菌も寄与していることが示唆された。さらに、余剰汚泥から溶出したリン酸のほとんどをジルコニウムフェライト系吸着剤によって回収することができ、プロセスに流入したリンの約 50% を回収可能であったことを示した。

第 3 章では、第 2 章において良好な処理性能を示した期間において、分子生物学的手法を用い、微生物叢を評価・解析することにより栄養塩除去を担う微生物の特定を行った。Cloning 法による解析の結果から、本プロセスにおいては、*Bacteroidetes*、 β -*Proteobacteria* および α -*Proteobacteria* に属する微生物が多く検出された。窒素除去を担う微生物としては、亜硝酸酸化細菌である *Nitrospira* 属が確認され、脱窒細菌としては、 α -*Proteobacteria* に属する *Hyphomicrobium* 属、 β -*Proteobacteria* に属する *Rhodocyclales*、*Comamonadaceae* が確認された。*Hyphomicrobium* 属、*Rhodocyclales* および *Comamonadaceae* の多くは細胞内にエネルギー源として polyhydroxyalkanoate (PHA) を蓄積することが報告されていることから、これらの微生物が無酸素槽において PHA を利用した脱窒反応を行っていることが示唆された。一方、リン除去性能に影響を及ぼすことが確認されている既知の PAOs および PAOs の阻害微生物であるグリコーゲン蓄積細菌 (GAOs)、G-bacteria についてはほとんど検出されなかった。FISH 法による定量的解析からも、 α -*Proteobacteria* および β -*Proteobacteria* がそれぞれバクテリア全体の 24%、21%と優占化していることが確認されたが、既知の PAOs である *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis'についてはわずかに 1%であり、GAOs として報告されている GB group については検出されなかった。以上のことから、本プロセスにおいては、既存のプロセスとは微生物叢が異なり、特に既知の PAOs の検出頻度が低いことから、従来とは異なる微生物が処理において重要な役割を担っていた可能性を示した。

第 4 章では、密度勾配遠心分離法による PAOs、GAOs および G-bacteria の集積効果について検討を行った。第 3 章における群集構造解析の結果からでは、新規の PAOs 等の候補を推定することは不可能である。硝化細菌および脱窒細菌とは

異なり、PAOsは指標となる機能遺伝子の報告が無いことから、新規のスクリーニング技術の開発が必要となる。そこで、モデルプロセスとして運転した嫌気/好気回分式活性汚泥リアクター（SBR）の汚泥を密度勾配遠心分離法に供試し、密度勾配遠心分離前後の微生物叢を T-RFLP 法により評価・解析した。その結果、*Cand. 'Accumulibacter phosphatis'* および GB group は高密度側のフラクションに選択的に回収された。一方、これまで PAOs、GAOs および G-bacteria として報告のない、*Acidobacteria*、*Bacteroidetes*、*Nitrospira* は低密度側のフラクションに回収された。このように、密度勾配遠心分離法により、生物学的リン除去において重要な役割を担わないと考えられる多くの微生物種が排除され、重要な役割を担う一部の微生物種のみを選択的に回収することが可能であることを示した。

第5章では、PAOsの基質資化状態を MAR-FISH 法により評価した。第2章において、オゾン処理により可溶化された有機酸により、好気槽におけるリン摂取を阻害することに成功したが、その効率については不明であり、そのためには標的細菌における有機物資化状態を評価する必要がある。本研究では、リン除去性能が良好である汚泥（EBPR 汚泥）およびリン除去性能を低下させた汚泥（non-EBPR 汚泥）を4種の混合比で混合し SBR にて運転を行い、各種水質評価において良好な処理性能を確認した時点において *Cand. 'Accumulibacter phosphatis'* の酢酸資化状態を評価した。その結果、EBPR 汚泥のみの系では全ての *Cand. 'Accumulibacter phosphatis'* が酢酸を資化することが確認された。その一方で、non-EBPR 汚泥のみの系では一部の *Cand. 'Accumulibacter phosphatis'* が酢酸を資化しておらず、PAOs とは異なる微生物との基質競合関係にあることが確認された。このことから、MAR-FISH 法は、各種水質評価法に比べ、より詳細に微生物の活性を評価することが可能であり、また、本手法が好気槽での有機物によるリン取り込み抑制評価に適当であることを示した。

第6章では、本論文の総括および展望を記述した。

以上、本論文では生物学的栄養塩除去プロセスにおいて問題となる余剰汚泥対策および枯渇化資源であるリン回収に着目したプロセスの開発・効率化を行った。余剰汚泥減容工程に微細気泡化オゾン処理、リン回収工程にジルコニウムフェライト系吸着剤を充填した吸着塔を付加した新規栄養塩除去プロセスを開発し、実排水への適用を行い、余剰汚泥を発生させることなく十分な栄養塩除去性能を得ることに成功した。また、特定が困難である PAOs 等を選択的に回収する手法を開発した。さらに、PAOs と他微生物群との基質競合関係について明らかにした。これらの研究成果は栄養塩除去プロセスの高度効率化のみならず環境浄化技術・資源循環技術および環境微生物学の発展に寄与することが期待される。

研 究 業 績

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>T. Kondo</u>, Y. Ebie, S. Tsuneda, Y. Inamori Characterization of deeply branched <i>Defluvicoccus</i>-relative glycogen-accumulating organisms in enhanced phosphorus removal systems <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i> (submitted)</p> <p>(2) (報文) <u>T. Kondo</u>, Y. Ebie, S. Tsuneda, Y. Inamori Characterization of the high-density bacteria in biological phosphorus removal process by using buoyant density separation <i>Japanese Journal of Water Treatment Biology</i> (revised)</p> <p>(3) (報文) <u>T. Kondo</u>, Y. Suzuki, Y. Ebie, S. Tsuneda, Y. Inamori Evaluation of advanced wastewater treatment process, A/O/A system combined with fine-bubbled ozonation and phosphorus adsorption systems <i>Water Research</i> (revised)</p> <p>○ (4) (報文) <u>T. Kondo</u>, Y. Ebie, N. Noda, N. Iwami, S. Tsuneda, Y. Inamori Determination of polyphosphate-accumulating organisms activity in enhanced biological phosphorus removal using conventional methods and microautoradiography-FISH <i>Japanese Journal of Water Treatment Biology</i> (in press)</p> <p>(5) (報文) R. Inamori, P. Gui, P. Dass, M. Matsumura, K-Q Xu, <u>T. Kondo</u>, Y. Ebie, Y. Inamori Investigating CH₄ and N₂O emissions from eco-engineering wastewater treatment processes using constructed wetland microcosms <i>Process Biochemistry</i> (in press)</p> <p>○ (6) (報文) Y. Suzuki, <u>T. Kondo</u>, K. Nakagawa, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Shimizu, Y. Inamori Evaluation of sludge reduction and phosphorus recovery efficiencies in a new advanced wastewater treatment system using denitrifying polyphosphate accumulating organisms <i>Water Science and Technology</i>, 53 (6), 107-113 (2006)</p> <p>(7) (報文) 鈴木康之, <u>近藤貴志</u>, 常田聡, 稲森悠平 マイクロバブル化オゾン酸化法および吸着脱リン法を組み込んだ新しい資源循環型排水処理システム <i>用水と廃水</i>, 48 (5), 424-431 (2006)</p> <p>(8) (報文) 稲森悠平, 中川和哉, 鈴木康之, <u>近藤貴志</u>, 常田聡, 平田彰 高度リン回収および余剰汚泥減容化を志向した排水処理プロセスの開発および評価 <i>用水と廃水</i>, 46 (8), 671-677 (2004)</p>

研 究 業 績

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>(9)（報文）<u>近藤貴志</u>，常田聡，平田彰，板山朋聡，稲森悠平 放射性同位体トレーサー法を用いた水圏生態系マイクロコズムに 及ぼすリンの影響評価 <i>日本水処理生物学会誌</i>，39 (4)，175-181 (2003)</p>
総説	<p>(1) 近藤貴志，常田聡 生物学的リン除去プロセスの最新動向 <i>化学工学</i>，70 (11)，616-620 (2006)</p> <p>(2) 近藤貴志，大坂利文，青井議輝，常田聡 生物学的窒素・リン除去プロセスにおける微生物生態と機能 <i>用水と廃水</i>，48 (1)，53-60 (2006)</p>
講演 (国際会議)	<p>(1) <u>T. Kondo</u>，Y. Ebie，S. Tsuneda，Y. Inamori Characterization of the high-density compounds containing organisms in enhanced biological phosphorus removal process <i>ISEB / ESEB / JSEB 2006</i>, Leipzig, Germany (July, 2006)</p> <p>(2) <u>T. Kondo</u>，Y. Ebie，S. Tsuneda，A. Hirata，Y. Inamori Characterization of active members in EBPR process by using MAR-FISH combined with buoyant density separation <i>The 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference</i>, Gold Coast, Australia (July, 2005)</p> <p>(3) <u>T. Kondo</u>，Y. Ebie，S. Tsuneda，A. Hirata，Y. Inamori Identification of polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal by using density separation and molecular techniques <i>The 1st IWA-ASPIRE Conference and Exhibition</i>, Singapore (July, 2005)</p> <p>(4) Y. Suzuki，<u>T. Kondo</u>，K. Nakagawa，S. Tsuneda，A. Hirata，Y. Shimizu，Y. Inamori Evaluation of sludge reduction and phosphorus recovery efficiencies in a new advanced wastewater treatment system using denitrifying polyphosphate accumulating organisms <i>The 1st IWA-ASPIRE Conference and Exhibition</i>, Singapore (July, 2005)</p> <p>(5) <u>T. Kondo</u>，S. Sasaki，T. Itayama，E. Takeda，S. Tsuneda，A. Hirata， Y. Inamori Introducing Radioactive Substrate to the Microcosm Systems to Study Effects of Nitrogenous Compounds Dosage on the Microbial Population and Material Flux in Aquatic Ecosystem <i>The 2nd IWA Asia-Pacific Regional Conference</i>, Bangkok, Thailand (October, 2003)</p>

研 究 業 績

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 (国内)	<p>(1) <u>近藤貴志</u>，常田聡，蛭江美孝，稲森悠平 汚泥減容・リン回収型栄養塩類除去プロセスに生息する微生物叢解析 日本水処理生物学会第43回大会，仙台（2006年11月）</p> <p>(2) 王延華，稲森隆平，徐開欽，稲森悠平，孔海南，<u>近藤貴志</u>，松村正利 Molecular biological analyses on the relationship between nitrogen removal and N₂O emission characteristics in the constructed wetland systems 日本水処理生物学会第43回大会，仙台（2006年11月）</p> <p>(3) <u>近藤貴志</u>，常田聡，蛭江美孝，稲森悠平 生物学的リン除去プロセスにおける微生物間基質資化競合関係解析 化学工学会第71回大会，東京（2006年3月）</p> <p>(4) <u>近藤貴志</u>，常田聡，蛭江美孝，稲森悠平 生物学的リン除去プロセスに存在する G-bacteria の生態解析 第40回日本水環境学会年会，仙台（2006年3月）</p> <p>(5) 鈴木康之，<u>近藤貴志</u>，常田聡，稲森悠平 マイクロバブル化オゾン酸化法および吸着脱リン法を組み込んだ新しい資源循環型排水処理プロセス 第40回日本水環境学会年会，仙台（2006年3月）</p> <p>(6) <u>近藤貴志</u>，常田聡，蛭江美孝，稲森悠平 生物学的リン除去における基質資化競合関係の分子生物学的評価 日本水処理生物学会第42回大会，静岡（2005年11月）</p> <p>(7) 鈴木康之，<u>近藤貴志</u>，常田聡，稲森悠平 マイクロバブル化オゾン処理および吸着脱リンを組み込んだ新規排水処理プロセスの実用化に向けた検討 日本水処理生物学会第42回大会，静岡（2005年11月）</p> <p>(8) 鈴木康之，<u>近藤貴志</u>，常田聡，平田彰，稲森悠平 ジルコニウムフェライト吸着剤によるリン回収工程を組み込んだ新しい排水処理システム 化学工学会秋季大会第37回大会，岡山（2005年9月）</p> <p>(9) <u>近藤貴志</u>，常田聡，平田彰，蛭江美孝，水落元之，稲森悠平 生物学的リン除去プロセスにおいて高活性を示す微生物の特定-密度勾配遠心分離法および MAR-FISH 法による評価- 第39回日本水環境学会年会，千葉（2005年3月）</p> <p><u>その他 14 件</u></p>