

〈特集〉

水処理プロセスからの亜酸化窒素排出削減への FISH 法適用の試み

齋藤利晃¹⁾, 小沼晋²⁾¹⁾ 日本大学理工学部土木工学科
(〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台1-8 E-mail: saitou.toshiaki@nihon-u.ac.jp)²⁾ 日本大学理工学部土木工学科
(〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台1-8 E-mail: konuma.susumu@nihon-u.ac.jp)

概要

生物反応槽から排出される亜酸化窒素 (N_2O) を削減するため、これまで DO や亜硝酸など環境条件を指標とする制御手法の開発が行われてきた。しかしながら N_2O 生成に及ぼす環境条件の影響の大きさは細菌の種類によって異なることから、細菌叢に着目した制御手法の開発が求められている。そこで本稿では、FISH 法を用いて活性汚泥中のアンモニア酸化細菌を2種類に大別し、加成性が成立するとして N_2O 生成能に及ぼす亜硝酸濃度の影響を分画することを試みた。更に、その知見に基づき、 N_2O 生成を抑制しうる曝気方式について検討した結果を報告する。

キーワード：活性汚泥, 亜酸化窒素, fluorescent in situ hybridization (FISH), *Nitrosomonas* 属, *Nitrosospira* 属
原稿受付 2018.1.11 EICA: 22(4) 46-50

1. はじめに

FISH 法は、これまでブラックボックスとして取り扱われてきた生物反応槽の中身、すなわち細菌叢を定量的に把握できる革新的なツールである。その存在を初めて知った時筆者は、細菌叢制御により生物学的排水処理の効率が飛躍的に改善されると予感した。しかし、自ら FISH 法を扱ってみると想定外に不確実性が大きく、実処理の現場において個々の細菌種の寄与を定量的に評価するには未だ発展途上の技術であるとの認識に至った。とはいえ、FISH 法は対象とする特定の細菌種を選択的に蛍光染色でき、顕微鏡で直接観察することにより細胞一つ一つを計測できるため、生物処理反応槽における個々の細菌種的能力を定量的に評価したいという誘惑は極めて強く、またそれが FISH 法に期待される役割であるとも考えている。本稿は、FISH 法の更なる応用展開を願い、不確実性が故に積極的に試みられて来なかった能力評価を取って試みた結果を報告するものである。

2. 水処理 N_2O 制御のための研究の方向性

2012 年度我が国の下水道事業から排出された約 627 万トンの CO_2 のうち約 11% は水処理プロセスからの N_2O 排出¹⁾ である。 N_2O は今世紀最大のオゾン層破壊物質であるとの報告²⁾ もあり、その排出削減は喫緊の課題とされている。**Fig. 1** は、水処理反応槽からの N_2O 排出を抑制するためのこれまでの取り組みと期

待される細菌叢制御についての概念を示したものである。これまでは、細菌叢をブラックボックスとして入力と出力の関係を経験的に積み重ねることにより制御手法の開発が試みられて来た。具体的には、曝気風量や SRT などを入力値として変化させ、結果として得られる出力情報としての N_2O 生成との関係を調べるといった手法である。このとき運転条件を変化させると水質も変化するため、運転条件と水質の関係及び水質と N_2O 生成の関係については詳細に研究がなされ、それらについては概ね知見が蓄積されてきたと言える。しかしながら、80 年代あたりからの長年にわたる取り組みにも拘らず決定的な手法の確立には至っていない。ブラックボックス的アプローチの限界と思われる。すなわち細菌種によって環境条件の影響³⁾ や N_2O の生成速度⁴⁾ が異なることから、運転方法の変更により

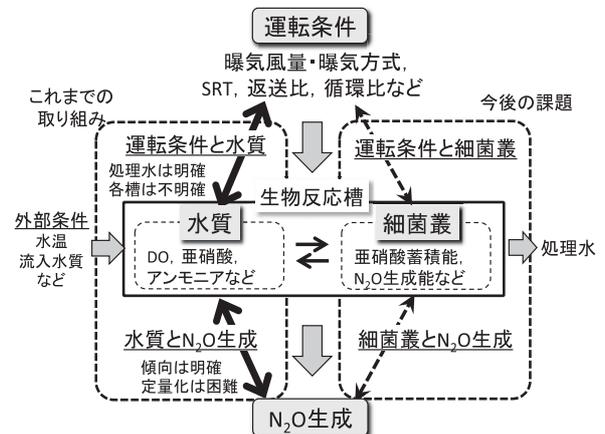


Fig. 1 Conceptual diagram of research strategy for N_2O reduction

境条件によって異なるものと考え、本研究では、細菌種によっても異なるものとして以下の方法により定量的に表現することを試みた。

(2) 実験方法

実験方法は極めてシンプルであり、通常のアムモニア酸化活性試験に排ガス中の N_2O 測定を加えた点のみが異なる。具体的には、実下水を処理するベンチスケール反応槽から汚泥を採取し、アムモニアを含まない無機栄養塩培地を用いて洗浄後、4 L の回分式反応槽に投入し、20 mgN/L になるようにアムモニア水溶液を添加して曝気を行った。概ね 5~20 分間隔で試料を採取し、アムモニア酸化の進行と亜硝酸の蓄積、亜酸化窒素の生成及び細菌叢を調べた。

(3) アムモニア酸化速度の分画結果

実測された単位汚泥量当たりのアムモニア酸化速度は 2 種のプローブを用いて分画した AOB のそれぞれによるアムモニア酸化の合計である。DO やアムモニアは十分に与えたため濃度依存性は無視できるとし、それぞれの活性は独立して加成性が成立するとして Eq. 1 を用い、それぞれの速度を振り分けた。

$$r_{obs} = R_{SPR} \cdot X_{SPR} + R_{MNS} \cdot X_{MNS} \quad (\text{Eq. 1})$$

r_{obs} : 観察されたアムモニア酸化速度 ($\text{mgN gVSS}^{-1} \text{h}^{-1}$)

R : アムモニア酸化速度 ($\text{mgN cell}^{-1} \text{h}^{-1}$)

X_{SPR} : *Nitrosospira* 属系 AOB 細胞数 (cell gVSS^{-1})

X_{MNS} : *Nitrosomonas* 属系 AOB 細胞数 (cell gVSS^{-1})

Table 1 にアムモニア酸化速度の分画結果を表す。曝気の制御方法を様々に変えて 2 年ほど運転した結果であるが、いずれの時期及び条件においても *Nitrosomonas* 属系の方が *Nitrosospira* 属系よりも大きな速度を有し、時期により *Nitrosospira* 属系は 3.5 倍、*Nitrosomonas* 属系は 2.5 倍の範囲でその大きさが変動していた。表中の文献値¹⁾は *Nitrosomonas europaea* 及び *Nitrosospira* sp. AV を土壤に分散させて測定して得られた結果であり、環境条件が異なるものの、*Nitrosomonas* 属系のアムモニア酸化速度の方が大きいこと並びにオーダーについては概ね一致している結果が得られた。

Table 1 Estimated ammonia oxidation rates

AOB の種類	測定値	文献値 ¹⁾
<i>Nitrosospira</i> 属系	$2.3 \sim 8.0 \times 10^{-11}$	2.8×10^{-11}
<i>Nitrosomonas</i> 属系	$1.4 \sim 3.6 \times 10^{-10}$	8.4×10^{-11}

単位: $\text{mgN cell}^{-1} \text{h}^{-1}$

(4) N_2O 転換率及び N_2O 生成速度の分画結果

同様に、実測された単位汚泥量当たりの N_2O 生成速度に加成性が成り立つとして、Eq. 2 から最小二乗法によりそれぞれの転換率を求めることができる。

$$\eta_{obs} \cdot r_{obs} = \eta_{SPR} \cdot R_{SPR} \cdot X_{SPR} + \eta_{MNS} \cdot X_{MNS} \quad (\text{Eq. 2})$$

η : 転換率 (-), η_{obs} : 観察された転換率 (-)

前述の通り DO やアムモニア濃度の影響は無視できるため、亜硝酸濃度で整理してその影響を整理した。**Fig. 4** に示される通り、ばらつきがあるものの、概ね亜硝酸濃度が高くなるにつれて N_2O 転換率が大きくなっている傾向が得られ、更にその傾向の大きさに両属系間で差異があり、亜硝酸の濃度域によって N_2O 転換率が逆転している結果が得られた。すなわち亜硝酸濃度概ね 0.3 mgN/L より低い条件では *Nitrosomonas* 属系が *Nitrosospira* 属系より 2 倍程度高い転換率を示し、0.4 mgN/L より高い条件下では逆に *Nitrosospira* 属系の方が高い転換率を示した。この結果から判断されることから、 N_2O 生成に及ぼす亜硝酸濃度の影響が AOB の細菌叢によって異なることであり、*Nitrosospira* 属系が多い場合は特に亜硝酸の蓄積を可能な限り避けることが望ましいと判断される。

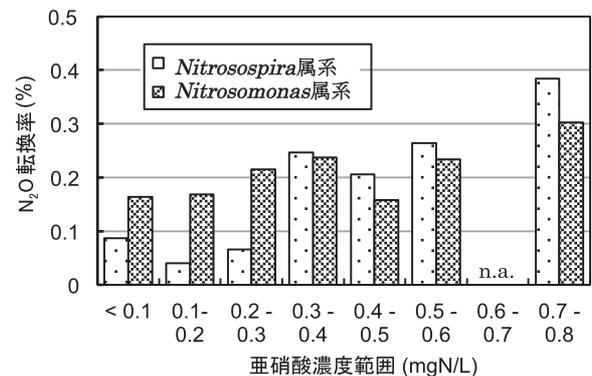


Fig. 4 Dependency of estimated N_2O conversion ratio of each AOB groups on nitrite concentration

以上により得られた N_2O 転換率とアムモニア酸化速度を乗じることで、 N_2O 生成速度を算出した結果を **Table 2** に示す。Shaw³⁾らと亜硝酸濃度レベルが異なるが 1 細胞当りの N_2O 生成速度は概ね同程度であり、また *Nitrosomonas* 属系の方が *Nitrosospira* 属系よりも大きい結果が示された。

Table 2 Estimated N_2O production rate

AOB の種類	測定値	文献値 ³⁾
<i>Nitrosospira</i> 属系	$0.17 \sim 0.42 \times 10^{-12}$	$0.11 \sim 1.6 \times 10^{-13}$ (注1)
<i>Nitrosomonas</i> 属系	$1.3 \sim 1.4 \times 10^{-12}$	$0.43 \sim 1.6 \times 10^{-12}$ (注2)

単位: $\text{mgN cell}^{-1} \text{h}^{-1}$

注 1) *Nitrosospira* sp. strain 40 kl, *Nitrosospira* sp. strain En13 及び *Nitrosospira* sp. strain NpAV の最大値と最小値

注 2) *Nitromonas europaea* ATCC19718, *Nitromonas europaea* ATCC25978 の最大値と最小値

Terada ら¹²⁾は高濃度アムモニア処理を目的とした研究において NEU で検出した *Nitrosomonas* 属優占汚泥の方が Nsv443 で検出した *Nitrosospira* 属優占汚

泥より低い N₂O 生成を得たと報告している。一見、対立する結果に思われるが、Terada らは亜硝酸濃度が 50 mgN/L を超える領域でのデータである。亜硝酸濃度が高いほど *Nitrosospira* 属系の N₂O 転換率が大きくなることから、高濃度領域では *Nitrosospira* 属系の N₂O 生成速度が大きくなる可能性を示唆しており、矛盾しないと考えている。

4.2 曝気方式と AOB 細菌叢

次に、N₂O の生成抑制を可能にする細菌叢を形成するための運転方法の検討を行なった。最も影響が大きかつ制御が比較的容易な曝気方式に注目して AOB 細菌叢との関係を調べた結果を Fig. 5 に、また N₂O 転換率の結果を Table 3 に示す。実験の詳細は文献¹⁰⁾を参照されたい。後段とあるものは流入側 3 槽の曝気風量を抑え、出口側 3 槽の曝気風量を大きくする曝気方式であり、曝気風量の差を特に大きくした系を(強)としている。図から、後段(強)方式において *Nitrosospira* 属系が優占し N₂O 転換率が低い傾向が得られたこと、前段の曝気風量を増やす方向に変えていくと *Nitrosomonas* 属系が増えて N₂O 転換率が高くなる傾向が示された。前段の曝気を抑えた系では 3 段目まで溶存酸素濃度平均値が 0.1 mg/L 程度の低い DO 条件下にあり、そのような環境条件下においては親和性戦略を有する *Nitrosospira* 属系⁶⁾を優占化できると考えられる。また、亜硝酸濃度は最大 0.3 mgN/L 以下に抑えられており、結果として後段(強)において N₂O 生成を抑制することができたと考えている。

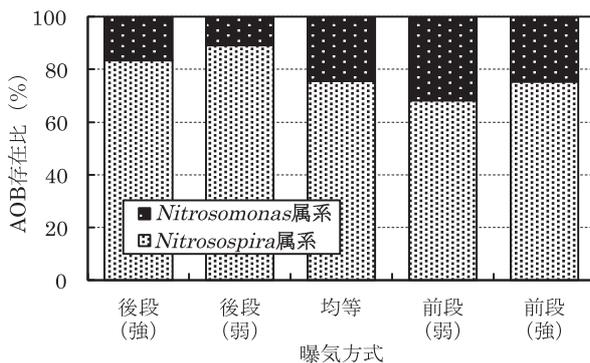


Fig. 5 Abundance ratio of AOB groups acquired from different aeration methods

Table 3 N₂O emission factors of different aeration methods

曝気方式	データ数	排出係数 (mgN ₂ O/m ³)	
		平均	標準偏差
後段(強)	18	47	33
後段(弱)	12	55	33
均等	31	63	54
前段(弱)	12	75	60
前段(強)	15	62	30

5. ま と め

Nso190 および NEU を用いてアンモニア酸化細菌を大きく *Nitrosospira* 属系及び *Nitrosomonas* 属系に分けて N₂O 生成能を評価することを試み、以下の結果を得た。

- 1) N₂O 転換率は亜硝酸濃度によって大小関係が逆転し、およそ 0.3 mgN/L 以下の低濃度では *Nitrosospira* 属系の方が小さく有利である。
- 2) 調査した亜硝酸濃度範囲では N₂O 生成速度は、いずれも *Nitrosomonas* 属系の方が大きい。
- 3) 標準活性汚泥反応槽における曝気方式を検討した結果、前段の曝気を抑え目とし、後段に強くする方式により、亜硝酸蓄積を抑制した上で *Nitrosospira* 属系を優占化し、N₂O 生成を抑えることが可能であった¹⁰⁾。

上述の結果は、N₂O 生成抑制に適した細菌叢を明らかにし、またその細菌叢を形成するための運転方法の確立に、FISH 法が寄与することを示したと言える。今後、加成性が成立するか否かの検証を含め、使用するプローブの妥当性、更には亜硝酸蓄積を生じにくい細菌叢などの検討が必要と考えているが、将来的な細菌叢による制御の道が見えてきたと考えている。

参 考 文 献

- 1) 環境省・国土交通省：下水道における地球温暖化対策マニュアル (平成 28 年 3 月)
- 2) A. R. Ravishankara, J. S. Daniel, and R. W. Portmann: Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century, Science, Vol. 326 (5949), pp. 123-125 (2009)
- 3) A. Schramm, D. de Beer, J. C. van den Heuvel, S. Ottengraf, and R. Amann: Microscale Distribution of Populations and Activities of *Nitrosospira* and *Nitrosospira* spp. along a Macroscale Gradient in a Nitrifying Bioreactor: Quantification by In Situ Hybridization and the Use of Microsensors, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65(8), pp. 3690-3696 (1999)
- 4) L. J. Shaw, G. W. Nicol, Z. Smith, J. Fear, J. I. Prosser, and E. M. Baggs: *Nitrosospira* spp. can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway, Environmental Microbiology, Vol. 8(2), pp. 214-222 (2006)
- 5) 内田優希, 齋藤利晃, 吉田征史, 小沼晋: 脱窒性ポリリン酸蓄積細菌の亜酸化窒素生成能とその数式モデル化, 下水道研究発表会講演集, Vol. 50, pp. 571-573 (2013)
- 6) M. A. Dytczak, K. L. Londry, and J. A. Oleszkiewicz: Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates, Water Research, Vol. 42(8), pp. 2320-2328 (2008)
- 7) H. Daims, K. Stoecker and M. Wagner: Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes, In Advanced Methods in Molecular Microbial Ecology, pp. 213-239. (Osborn AM, Smith CJ, ed.) Bios-Garland, Abingdon, UK (2005)

- 8) P. Wunderlin, M. F. Lehmann, H. Siegrist, B. Tuzson, A. Joss, L. Emmenegger and J. Mohn: Isotope signatures of N_2O in a mixed microbial population system: Constraints on N_2O producing pathways in wastewater treatment, *Environmental Science & Technology*, Vol. 47, pp. 1339-1348 (2013)
- 9) L. Guo and P. A. Vanrolleghem: Calibration and validation of an activated sludge model for greenhouse gases no. 1 (ASMG1): prediction of temperature-dependent N_2O emission dynamics, *Bioprocess Biosystem Engineering*, Vol. 37(2), pp. 151-163 (2014)
- 10) 草野 吏, 小沼 晋, 鈴木 重浩, 齋藤 利晃, 濱本 亜季, 小林 政行: 送風量制御による下水処理における一酸化二窒素の排出削減方法, *環境システム計測制御学会誌*, Vol. 19(2), pp. 106-114 (2014)
- 11) A. E. Taylor and P. J. Bottomley: Nitrite production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. AV in soils at different solution concentrations of ammonium, *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 38, No. 4, pp. 828-836 (2006)
- 12) A. Terada, S. Sugawara, T. Yamamoto, S. Zhou, K. Koba, and M. Hosomi: Physiological characteristics of predominant ammonia-oxidizing bacteria enriched from bioreactors with different influent supply regimes, *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 79, pp. 153-161 (2013)