

汚泥の微生物処理と有用藻類生産を繋ぐ 高濃度硝化プロセスの開発

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
小山 光彦

1. はじめに

有機汚泥は植物の生育に重要な肥効成分を豊富に含むため、資源循環の観点から堆肥化による農地還元利用が推進されている。一方で、堆肥化過程ではアンモニアが大量に発生して大気中に揮発するが、ほとんどの堆肥化施設では回収・利活用していない。アンモニアガスは悪臭源であり、現場や周辺的生活・労働環境を悪化させるため、回収して窒素資源として利用する方法の確立が求められている。

近年、著者らは堆肥化システムを改変し、汚泥中の有機態窒素をアンモニアガスに高効率変換して、付加価値の高い微細藻類生産の窒素源に用いる新規プロセスを確立した¹⁾⁻³⁾。藻類が生産するアスタキサンチンなどのカロテノイド色素は健康食品や化粧品の原料として 10-50 万円/kg で販売される高付加価値物質であり、アンモニアガスは汚泥から分離されたクリーンな窒素源として高付加価値藻類の培養に利用可能である。しかし、多くの微細藻類種はアンモニア耐性が低いために適用可能な種に限られる。そこで、アンモニア態窒素を毒性の低い硝酸態窒素に変換することで、より多くの高付加価値藻類の効率的な高密度培養を実現し、臭気抑制ならびに利益創出が期待できる、と着想した。

硝化法は好気性の化学合成独立栄養細菌である硝化細菌（アンモニア酸化細菌（ammonia oxidizing bacteria: AOB）と亜硝酸酸化細菌（nitrite oxidizing bacteria: NOB））の協働で、常温常圧でアンモニウムイオン（ NH_4^+ ）を亜硝酸イオン（ NO_2^- ）経由で硝酸イオン（ NO_3^- ）に逐次酸化するプロセスである。硝化法は、オストワルト法や電解法といった物理化学プロセスと比較してエネルギー消費が少なく、設備のコストや安全性に優れているため、小規模施設への導入に適していると考えられる。

アンモニアガス発生源の施設から硝酸溶液をコストとエネルギーをかけずに輸送し貯留するには、できる限り高濃度の硝酸溶液を生産する必要がある。しかし従来の硝化技術は 10~100 mg-N/L 程度の低濃度の硝酸を蓄積させることしかできない^{4),5)}。これは、硝化技術はアンモニウム含有排水からの窒素除去プロセスの初期段階に位置付けられており、アンモニウムイオンを硝酸イオンに変換した後、嫌気性脱窒細菌によって硝酸イオンを窒素ガスに還元して除去するためである。従って、従来の硝化技術は、硝酸イオンが蓄積しない事を前提として、反応の高速化や菌体の保持が主に研究されてきた。

そこで申請者は、高濃度アンモニアならびに高濃度硝酸を槽内に保持して中和させる新規硝化システムを考案した（特願 2024-137849）。このプロセスの基本原理は、(I) 高濃度の硝酸塩が蓄積する高浸透圧環境に耐性を持つ硝化菌群を定着させて高活性を維持すること、(II) アンモニアと硝酸を槽内で中和させて共蓄積させて硝化菌の至適 pH を維持すること、(III) pH 制御装置と電気透析法を用いて無機アルカリ剤を循環させることで、薬剤コストを抑えつつアンモニア濃度の変動に自動対応して pH 調整すること、である。生産された高濃度の硝酸溶液は、

可搬性が高くかつ長期保存可能な藻類培養の窒素源であり、藻類培養施設に輸送後、希釈して藻類培地として利用する。これにより、多くの藻類の生産に利用可能な硝酸アンモニウム溶液の濃縮培地を作ることができると考えられる。そこで本研究は、アンモニアと硝酸を高濃度に蓄積させる新規硝化システムの構築を目的として、運転条件の基礎検討を行った。なお、本研究では電気透析法によるアルカリ剤の循環はシステムの単純化のために行わなかった。

2. 実験方法

実験 1. 高濃度の硝酸とアンモニアが共蓄積する環境における未馴養の硝化菌群の動態評価

はじめに、未馴養の硝化菌群を用いて高濃度硝化環境に対する応答を評価する実験を行った。種菌には、下水処理場の好気槽から採取した汚泥を用いた。0.5-1.0 mol/L に希釈したアンモニア水の供給量を pH コントローラーで制御するラボスケール硝化システムを構築した。硝化リアクターの有効容積は 500 mL、pH の設定下限値は 7.0、温度 25°C とした。硝化リアクターに硝酸アンモニウムを添加し、実験開始時の硝酸態窒素濃度とアンモニア態窒素濃度をそれぞれ 7,000 mg-N/L、1,400 mg-N/L に調整した。硝化の進行による pH の低下に伴ってアンモニア水を自動供給して pH7 を維持する運転を実施した。亜硝酸イオンの蓄積が見られた 13 日目にはアンモニア水の供給を停止し、代わりに水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を制御した。

実験 2. 高濃度硝酸・低濃度アンモニア環境における硝酸蓄積能と硝化菌群の適応過程の評価

硝化菌群を高濃度硝化環境に適応させるため、2 台の硝化リアクターを用いて実験を行った。それぞれのリアクターに異なる種菌を接種し、アンモニアを半連続的に供給することで、徐々に高濃度の硝酸が蓄積する環境を構築した。リアクター#1 には、下水処理場の好気槽から採取した汚泥を種菌として用いた。リアクター#2 には、亜硝酸イオン濃度 5,023 mg-N/L および硝酸イオン濃度 3,111 mg-N/L を蓄積して亜硝酸酸化が阻害された高濃度硝化リアクターの汚泥上澄み液を希釈し、亜硝酸イオン濃度を 300 mg-N/L に調整したものを種菌として使用した。

リアクター内の pH は pH コントローラーを用いて 7.0~7.5 に維持し、アンモニア水を基質兼 pH 調整剤として供給した。亜硝酸イオン濃度が上昇した場合は、アンモニア水の供給を停止し、水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を制御し、亜硝酸イオン濃度が再び低下した際にアンモニア水の供給を再開した。両リアクターは運転中、温度 25°C に維持した。

分析方法

アンモニウムイオンと亜硝酸イオン濃度の分析には、パックテスト (Kyoritsu Chemical-Check Lab., Crop., Japan) による比色法を用いた。硝酸イオン濃度の分析には、硝酸イオンメーター (LAQUAtwin, Horiba, Japan) を使用した。非解離アンモニア態窒素 (free ammonium nitrogen: FAN) 濃度ならびに非解離亜硝酸態窒素 (free nitrite nitrogen: FNN) 濃度は、総アンモニア態窒素 (total ammonium nitrogen: TAN) 濃度、総亜硝酸態窒素 (total nitrite nitrogen: TNN) 濃度、リアクター内の pH および温度を基に算出した。これらの計算には、pH と温度条件に依存する解離平衡定数 (pKa) を使用し、総濃度から非解離型 (非イオン型) の濃度を求めた。

経時的に採取した汚泥試料から DNA を抽出して 16S rRNA 遺伝子を解析し細菌叢の種組成を調べた。ISOIL for Beads Beating Kit (ニッポンジーン) を用いて、サンプル中に存在する細菌叢の DNA を抽出した。実験 1 においては、多サンプル中の細菌叢の遷移を低コストで網羅的に解析することを目的として、16S rRNA 遺伝子の V3 および V4 領域を、Illumina 社の 16S メタゲノム配列決定ライブラリープロトコールに従い増幅し、シーケンシングは外注した。実験 2 においては、硝化細菌の種レベルまで同定することを目的として、16S rRNA 遺伝子の全長を解析した。PacBio 社の 16S メタゲノム配列決定ライブラリープロトコールに従い増幅し、シーケンシングする一連の工程を外注した。16S rRNA 配列データは QIIME2 ver.2024.10 を用いて解析した。SILVA データベース (ver.138 99% OTUs 全長配列) で学習させたナイーブベイズ分類器を用いて、ノイズ除去されたリードを OTU に分類した。実験 2 の細菌叢の相対存在度データについては、Krona Tools を用いて可視化を行った。

3. 結果と考察

実験 1. 高濃度の硝酸とアンモニアが共蓄積する環境における未馴養の硝化菌群の動態評価

実験開始時の硝酸態窒素濃度とアンモニア態窒素濃度がそれぞれ 7,111 mg-N/L、1,356 mg-N/L の条件下で、pH の低下に伴いアンモニア水を自動供給して pH7 を維持する運転を開始したところ、実験 13 日目から亜硝酸イオン濃度の急激な上昇が確認され、硝化反応が完全に進行しないことが観察された (図 1A)。図には示さないが、非解離アンモニア態窒素は実験開始直後の時点で 7.6 mg-N/L であった。細菌は、アンモニアがイオン態であれば細胞膜上のイオンチャンネルでイオンの取り込み量を調節できるが、非解離アンモニアは細胞膜を自由に通過して細胞内 pH バランスを崩すことで細菌の活性を阻害する。低濃度硝化の先行研究では、文献により大きな差異が見られるが、非解離アンモニアの阻害濃度が 1–36 mg-N/L であることが報告されている⁶⁾。細菌叢を解析したところ、硝化の一段階目を担う AOB である *Nitrosomonas* の相対存在度が顕著に増加した一方で、二段階目の反応を担う NOB の *Nitrospira* は殆ど確認されなくなった (図 1B)。これらの結果より、高濃度の硝酸アンモニウムによる高浸透圧環境、および/または、高い非解離アンモニア濃度に対して、*Nitrosomonas* は適応できるが *Nitrospira* は適応することができず、硝化反応の二段階目が律速段階になることが明らかとなった。そこで、高濃度硝化の環境に適応可能な NOB を馴養させることが必要であると考えられた。

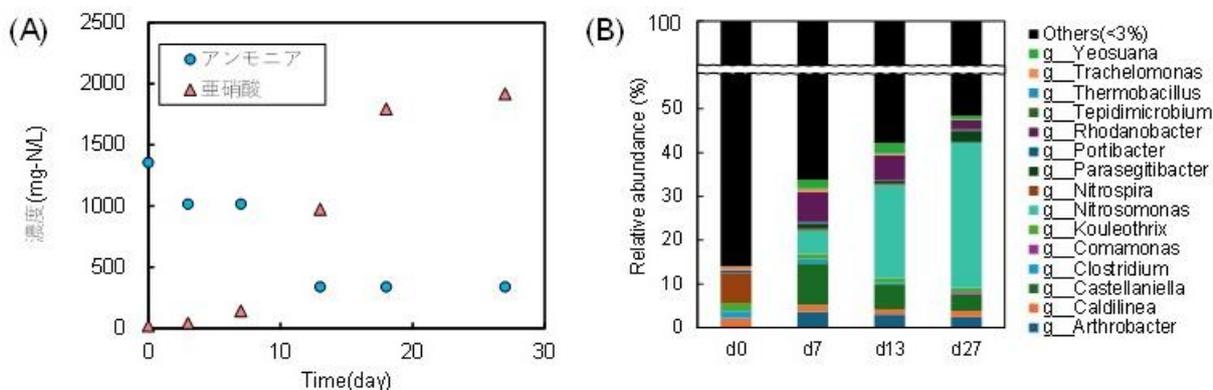


図 1. 未馴養の硝化菌群を用いた高濃度硝化における、(A) アンモニウムと亜硝酸濃度ならびに (B) 細菌叢の経時変化。

実験 2. 高濃度硝酸・低濃度アンモニア環境における硝化菌群の適応過程と硝酸蓄積能の評価

図 2 に硝化リアクターの pH ならびに窒素動態の経時変化を示した。アンモニア供給期間における硝化反応の進行に伴って硝酸態窒素濃度は両リアクターともに約 60-90 日目にかけて上昇し、リアクター#1 では約 6,000-7,000 mg-N/L、リアクター#2 では約 7,000-8,000 mg-N/L の高濃度に到達した。近年の研究では、硝化細菌を用いてヒトの尿を高濃度の硝酸イオン溶液に変換して窒素肥料として利用する試みが進められており、多量の pH 調整剤を連続供給することで 2,000~3,000 mg-N/L の硝酸イオン濃度が達成されている⁷⁾。この硝酸イオン濃度は尿中の窒素濃度に依存しており、これを超える高濃度での硝化菌の動態に関する知見はこれまでなかった。本研究の結果は、世界で類を見ないほど高濃度の硝酸を蓄積させても、硝化微生物が適応すれば硝化できるようになることを明らかにした。

好塩菌に関する先行研究では、一部の硝化菌が塩分 60~80 g/L (溶質濃度 50~67 atm に相当) という高浸透圧環境に適応できることが報告されている⁸⁾。本研究における溶質濃度は 0.5-0.6 mol/L に相当し、高濃度の硝酸イオンと中和剤のナトリウムイオンまたはアンモニウムイオンが存在する高浸透圧環境下でも硝化反応を進行させることができる硝化微生物が約 60-90 日目をかけて適応したことが示唆された。硝酸態窒素濃度はリアクター#2 の方が約 1,000 mg-N/L 高い値であり、高浸透圧環境により耐性が高い硝化微生物が優占化した可能性が示唆された。

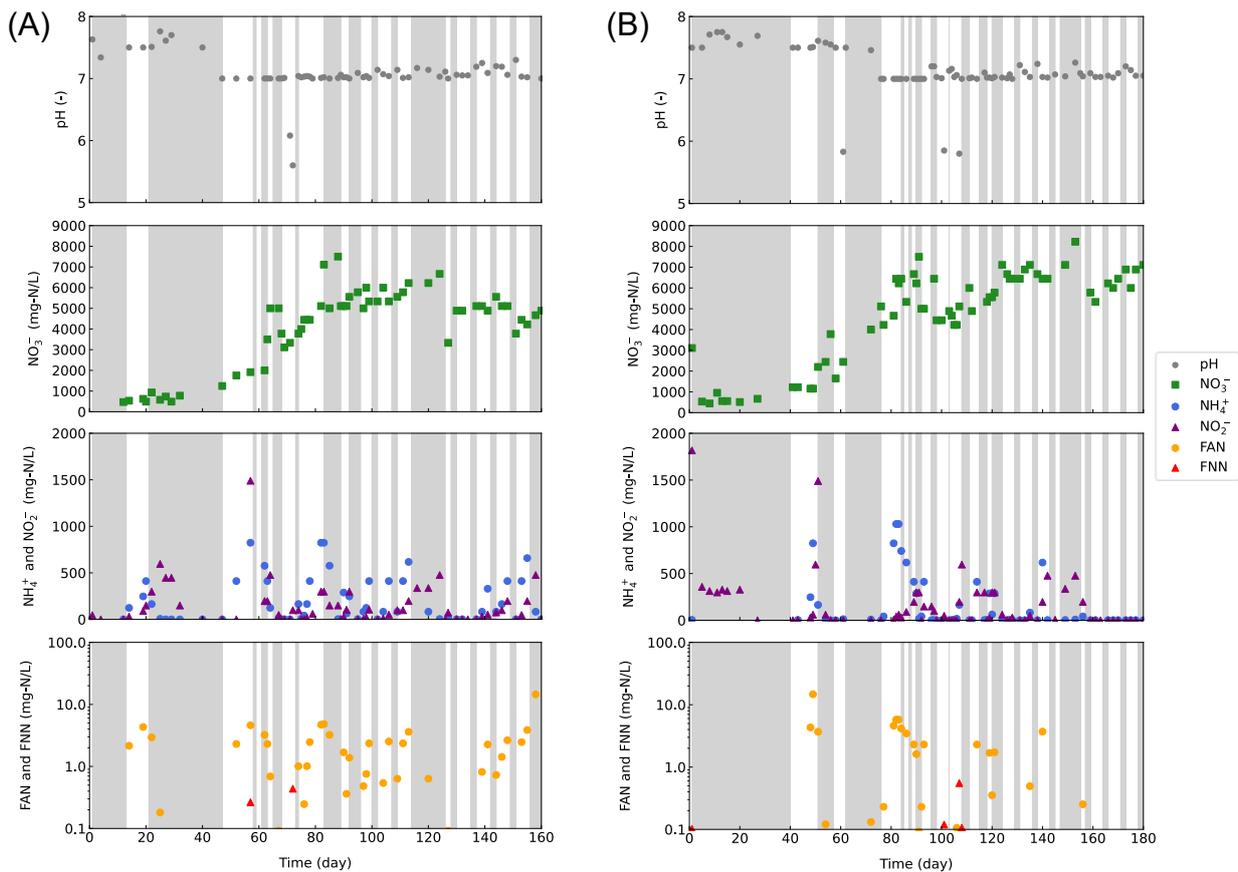


図 2. 硝化リアクターにおける pH、硝酸態窒素 (NO_3^- -N)、亜硝酸態窒素 (NO_2^- -N)、アンモニウム態窒素 (NH_4^+ -N)、非解離アンモニア窒素 (FAN)、および非解離亜硝酸窒素 (FNN) の濃度の経時変化。(A)リアクター#1、(B)リアクター#2。灰色の背景は、アンモニア供給を停止して代わりに水酸化ナトリウム水溶液を自動添加して pH 調整した期間を示す。

アンモニア供給期間中の硝酸生成速度を計算した (図 3)。両リアクターとも亜硝酸が蓄積しない期間の硝酸生成速度は概ね 100~400 mg-N/L/d の範囲を推移しており、この値が本システムの平均的な硝化能力であると考えられた。なお、突発的なピークであるが、リアクター#1 では 97 日目に最大硝酸生成速度 1,000 mg-N/L/d、リアクター#2 では 86 日目に最大 1,778 mg-N/L/d を記録した。従来の硝化プロセスでは、脱窒プロセスとの併用が一般的であるため、硝酸生成速度に関する具体的な報告は限られている。一方で、比較可能な代替指標としてアンモニア除去速度が挙げられる。高塩分・高アンモニア濃度条件下におけるアンモニア除去速度は 160 mg-N/L/d と報告されており⁹⁾、低濃度の硝酸イオンが蓄積する通常の硝化プロセスでは、44-2,500 mg-N/L/d の範囲とされている。これらと比較すると、本研究の硝酸生成速度は、通常の硝化プロセスの一部と同程度の能力を有しているが、さらなる性能向上の可能性も示唆される。本研究では、基質および pH 調整剤としての役割を兼ねているため、供給速度が大きく変動したが、今後は水酸化ナトリウムなどの無機アルカリ剤を用いた pH 制御を併用し、アンモニアを定速で供給する方式を採用することで、硝化菌への負荷を軽減できると考えられる。これにより、より高いアンモニア負荷速度条件での運転が可能となり、硝酸生成能力のさらなる向上が期待される。

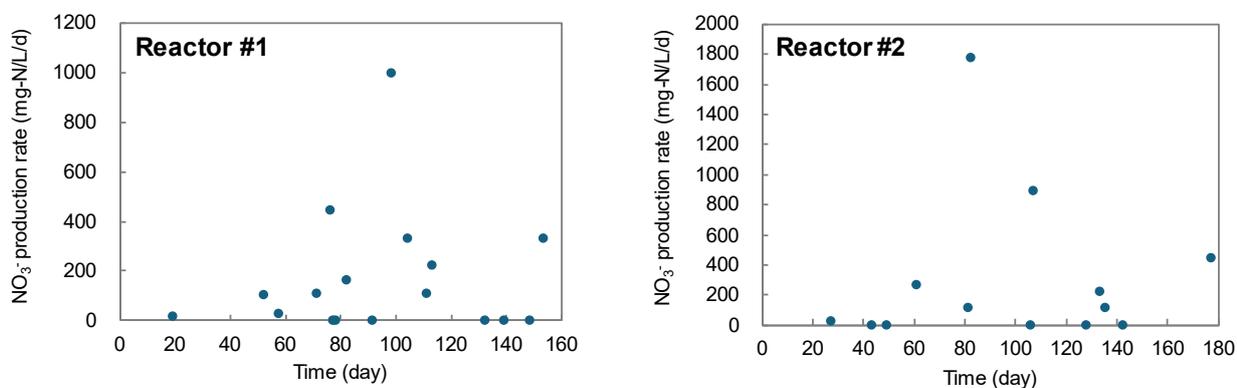


図 3. 硝化リアクターにおける硝化速度の経時変化。

より高濃度の硝酸態窒素が蓄積したリアクター#2 の運転 84 日目における細菌叢の相対存在度を図 4 (次ページ) に示した。独立栄養硝化細菌に注目すると、AOB の *Nitrosomonas eutropha* と NOB の *Nitrobacter hamburgensis* がそれぞれ優占しており、他の硝化細菌は検出されなかった。*Nitrosomonas eutropha* は塩分 30 g/L (溶質濃度 0.5 mol/L) において硝化リアクターに優占することが知られており¹⁰⁾、*Nitrobacter hamburgensis* は NaCl 濃度 0.4 mol/L の条件においても亜硝酸酸化能力を有することが報告されている¹¹⁾。したがって、高浸透圧環境に耐性を有する上記の硝化細菌が増殖したことにより、高硝酸濃度条件においても硝化が可能になったことが明らかとなった。

4. まとめ

高濃度アンモニアならびに高濃度硝酸を槽内に保持して中和させる新規硝化システムを考案し、運転条件の基礎検討ならびに硝化に貢献する主要微生物の動態を解析した。実験開始時の硝酸態窒素濃度とアンモニア態窒素濃度が高い条件では、硝化の二段階目の反応を担う NOB の *Nitrospira* が適応できず、硝化が破綻することが分かった。一方で、高濃度硝酸・低濃度アンモニア環境に徐々に硝化菌群を馴養することにより、高浸透圧環境に適応できる AOB

の *Nitrosomonas eutropha* と NOB の *Nitrobacter hamburgensis* がそれぞれ優占した。硝酸態窒素濃度が約 7,000-8,000 mg-N/L の高濃度の硝酸を蓄積させても、硝化微生物が適応すれば硝化できるようになることが初めて明らかとなった。

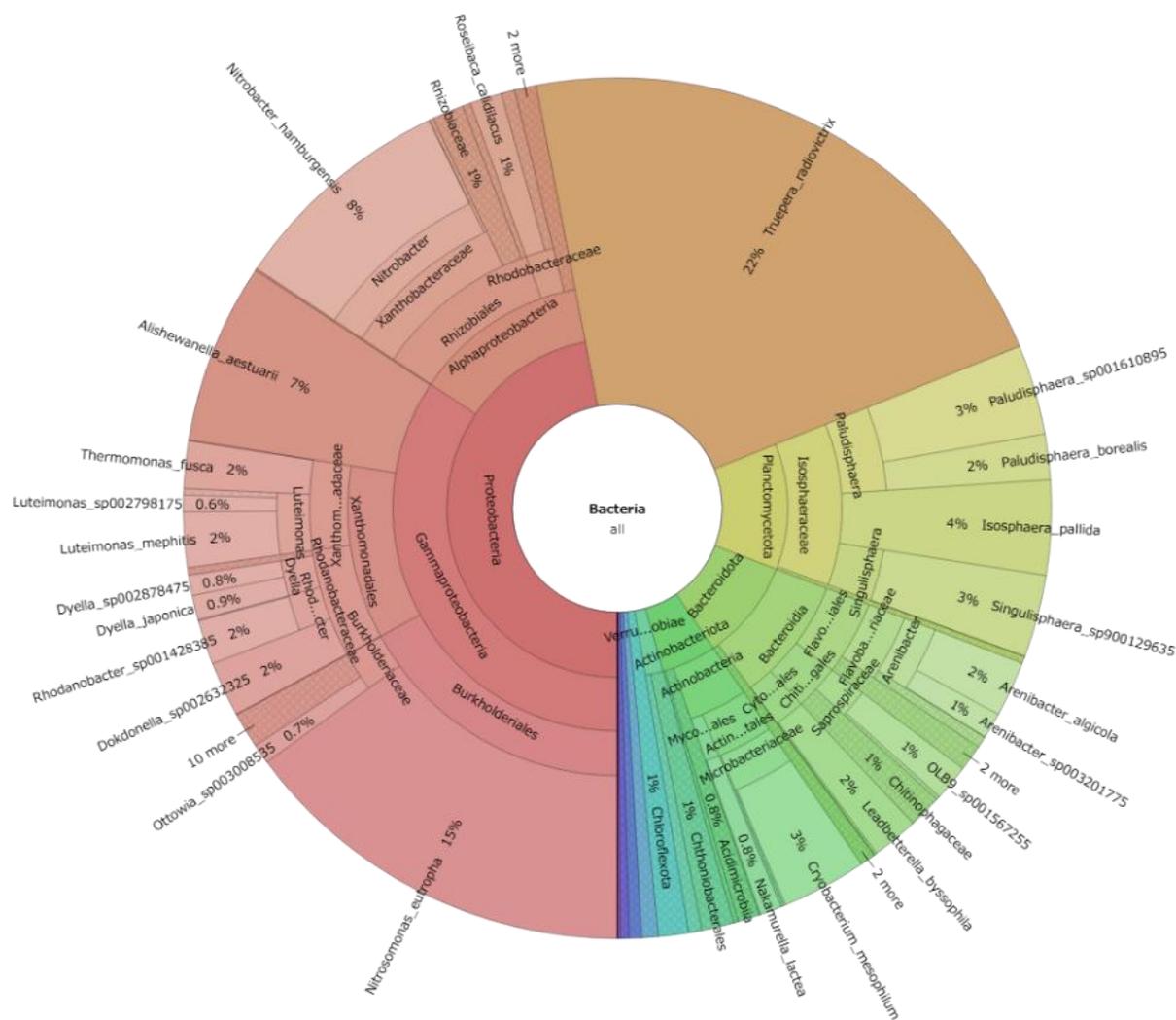


図 4. リアクター#2 の運転 84 日目における細菌叢の相対存在度。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。加えて、下水汚泥試料を提供していただいた大村市上下水道下水道施設課に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Koyama, M. *et al.* Effect of temperature on thermophilic composting of aquaculture sludge: NH₃ recovery, nitrogen mass balance, and microbial community dynamics. *Bioresour Technol* **265**, 207–213 (2018).

- 2) Koyama, M. *et al.* Effect of Ca(OH)₂ dosing on thermophilic composting of anaerobic sludge to improve the NH₃ recovery. *Science of The Total Environment* **670**, 1133–1139 (2019).
- 3) Tie, H. O. *et al.* Integrated nutrient recycling: Ammonia recovery from thermophilic composting of shrimp aquaculture sludge via self-heated bench-scale reactor and mango plant growth enhancement by the compost. *Waste Management* **180**, 55–66 (2024).
- 4) Luo, G., Zhang, N., Cai, S., Tan, H. & Liu, Z. Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly-β-hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates. *Aquaculture* **479**, 732–741 (2017).
- 5) Hasebe, Y. *et al.* High-rate nitrification of electronic industry wastewater by using nitrifying granules. *Water Science and Technology* **76**, 3171–3180 (2017).
- 6) Zhang, F., Yang, H., Wang, J., Liu, Z. & Guan, Q. Effect of free ammonia inhibition on NOB activity in high nitrifying performance of sludge. *RSC Adv* **8**, 31987–31995 (2018).
- 7) Wang, F. *et al.* Biological nitrification-based nutrient recovery technologies for source-separated urine treatment: A critical review. *Desalination* **591**, 118027 (2024).
- 8) Cui, Y. W., Zhang, H. Y., Ding, J. R. & Peng, Y. Z. The effects of salinity on nitrification using halophilic nitrifiers in a Sequencing Batch Reactor treating hypersaline wastewater. *Scientific Reports* **2016 6:1** **6**, 1–11 (2016).
- 9) Vanotti, M., Martinez, J., Fujii, T., Szögi, A. & Hira, D. Ammonia Removal Using Nitrification and Anammox in a Single Reactor. *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2012, ASABE 2012* **3**, 1- (2012).
- 10) Jeong, D., Cho, K., Lee, C. H., Lee, S. & Bae, H. Effects of salinity on nitrification efficiency and bacterial community structure in a nitrifying osmotic membrane bioreactor. *Process Biochemistry* **73**, 132–141 (2018).
- 11) Starkenburg, S. R. *et al.* Complete genome sequence of *Nitrobacter hamburgensis* X14 and comparative genomic analysis of species within the genus *Nitrobacter*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2852–2863 (2008).