

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780326

研究課題名(和文) アナモックス反応と脱窒反応の共存による畜産廃水処理の研究

研究課題名(英文) Anammox coupling with nitrate reduction for livestock wastewater treatment

## 研究代表者

和木 美代子(Waki, Miyoko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・畜産環境研究領域・主任研究員

研究者番号：10355092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：畜舎廃水の浄化処理において窒素除去の向上を図るために、硝酸還元・アナモックス反応による窒素除去を検討した。当該反応への電子供与体として、無機系電子供与体では水素が適することが明らかとなった。また、農業現場由来電子供与体として、イナワラ、オガクズ、モミガラを比較した結果、モミガラが効果的に利用できる可能性が示された。しかし、モミガラを用いて回分式リアクターの連続運転試験を行った結果は期待した効果が得られず、当該資材の利用には、リアクター形状や添加量などの検討が今後必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Anammox coupling with nitrate reduction was studied under inorganic electron donors and under organic solid electron donors, using sludge acclimatized to have anammox and denitrification activities. Hydrogen, in inorganic electron donors, was shown to be advantageous. Rice husk, in organic solid electron donors, was effective than rice straw or sawdust. However, wastewater treatment using sequencing batch reactor for anammox coupling with nitrate reduction added rice husk could not remove nitrogen effectively.

研究分野：畜産環境

キーワード：アナモックス 畜舎廃水

1. 研究開始当初の背景

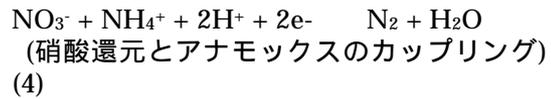
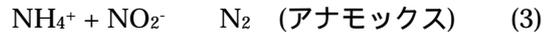
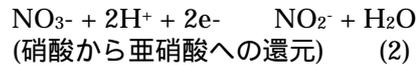
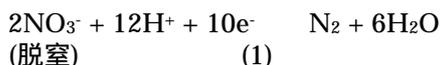
我が国の公共用水域の窒素汚染は深刻な環境問題であり、年間消費化学肥料窒素の約 1.5 倍の窒素を含む家畜排泄物は主要な汚染原因の一つとされている。また 2001 年には公共用水域への排水水質に関して、水質汚濁防止法に硝酸性窒素類の排出を規制する項目が追加された。当該規制の対象となる多くの事業所を含む畜産において、その排水の窒素対策は喫緊の課題となった。

水系の窒素成分を微生物反応により窒素ガスとして除去する脱窒反応は有効な窒素除去方法であるが、畜産排水からの脱窒反応は長く困難とされていた。それは畜産排水の炭素/窒素バランスが悪く、一般的な排水処理方法では脱窒反応の過程において電子供与体となる有機炭素源が不足することにあつた。また有機炭素除去を第一の目的として広く導入されている活性汚泥処理において、畜産排水はその水量や組成が飼養頭数や季節による温度の変化により影響を受けるため、処理性能が非常に不安定である。活性汚泥処理の処理水中の窒素は、硝酸・亜硝酸・アンモニアまたはその混合状態として排出され、成分および構成比が変動することが(和木美代子 et al. 2010)、本来その後段に置かれる窒素除去処理過程を一層困難なものとしている。

アナモックス反応は 1990 年代に発見された微生物による新規窒素除去反応である(Strous et al. 1997)。本反応の特徴は亜硝酸とアンモニアのカップリングにより窒素ガスが除去されることにあり、すなわち硝酸または亜硝酸の還元をメタノール等有機物の酸化とカップリングさせる従来の脱窒反応のように電子供与体を必要としない。

アナモックス処理の実用化に際しての関門の一つが、反応の前処理としての亜硝酸化である。温度、溶存酸素濃度等の制御により汚水の約半分を亜硝酸にし、残りをアンモニアにする前処理が試みられているが、いずれも高度な制御や加温等のエネルギーを必要とする技術である。この問題を回避する一つの方法として、亜硝酸化の制御を行わず、容易に行える硝酸化された窒素とアンモニアから、脱窒菌による硝酸還元反応とアナモックス反応を組み合わせることによる窒素除去が試みられている。

本方法は硝酸還元のための電子供与体の添加が必要であるが、式(1)で示す硝酸からの完全な脱窒に比べ、式(2-4)が示す硝酸還元とアナモックスの組み合わせの場合必要な電子数は理論上は除去窒素あたり 10 から 2 に削減される。さらに脱窒菌・アナモックス菌の多様な菌相は、上述のような畜産排水の活性汚泥処理後の窒素組成の変化に柔軟な対応が可能と予測される。



本方法の電子供与体として、酢酸、揮発性脂肪酸、汚水原水、硫黄が検討されてきたが(Kalyuzhnyi et al. 2006, Sumino et al. 2006)、有機炭素に関しては過剰添加により脱窒菌が増殖してしまう現象が生じ(この現象は連続処理においてアナモックス菌の装置からの流出を引き起こす)、添加量の制御が課題となっている。

2. 研究の目的

そこで本課題では、硝酸還元とアナモックス反応を組み合わせた窒素除去において、無機系電子供与体および、有機系不溶性電子供与体を用いることを試みる。

水素等、無機系電子供与体は、それを用いた菌体の増殖が緩やかであり、脱窒菌の過剰増殖がおこらない可能性がある。また、稲わら、おが屑等の農業現場で入手しやすい不溶性有機物はゆるやかな脱窒処理に利用できることが示されている。これらを電子供与体として添加すれば、畜産排水の原水中有機物に比べ過剰添加のリスクは小さいと期待される。

3. 研究の方法

(1) 無機系電子供与体の硝酸還元・アナモックス反応への影響

無機系電子供与体存在下での硝酸・アンモニアからのアナモックス活性および脱窒活性を安定同位体窒素を用いて測定し、評価した。詳細には、脱窒活性およびアナモックス活性を保持する汚泥を用い、合成無機塩培地中、無酸素条件下でバッチ培養した。処理区として、培地に、硝酸およびアンモニアを加え、電子供与体として水素および鉄を添加した。コントロール区として、培地に亜硝酸およびアンモニアを添加し、電子供与体無添加で培養を行い、処理区のコントロール区に対する活性比で評価した。

(2) 農業現場由来電子供与体の硝酸還元・アナモックス反応への影響

電子供与体として、モミガラ、イナワラ、オガクズ(針葉樹由来)を用い、これらおよび硝酸・アンモニアの存在下での培養による、アナモックス活性の変化について評価した。詳細には、脱窒活性およびアナモックス活性を持つ汚泥を、硝酸およびアンモニアを含有する畜産排水の活性汚泥処理水中で、培養瓶を用い、無酸素条件下で一ヶ月培養した。培

地には上述の電子供与体を添加し培養をおこない、また、同様の方法で電子供与体添加無し（コントロール）の培養もおこなった。培養中は 5-7 日間おきに窒素成分を測定し、静置後の上清 30mL を新たな汚水と交換した。培養の前後においてアナモックス活性を安定同位体法により測定した。

### （3）連続培養試験

モミガラを用いて回分式リアクターの運転を行った。有効容積 200 mL の完全混合型リアクターに、硝酸およびアンモニア含有畜産排水の活性汚泥処理水を流入させ、HRT1 日、無酸素条件下で運転した。脱窒活性およびアナモックス活性を保持する汚泥を種汚泥として添加し、同構成の 2 台のリアクターを同時に運転し、運転開始 2 週間後に一方にモミガラ 50mL を添加した。運転期間中の窒素成分の変化およびアナモックス活性の変化を調べた。

## 4. 研究成果

（1）供試汚泥は亜硝酸およびアンモニアを含有する培地中、電子供与体無添加条件において、明確なアナモックス活性を示した。電子供与体を添加しない硝酸およびアンモニアを含有する培地でのアナモックス活性はコントロールの 40% 程度であり、亜硝酸の供給が制限されているためと考えられた。水素の硝酸およびアンモニア含有培地への添加では、アナモックス活性がコントロールの 73% まで上昇し、水素利用の硝酸還元反応とそれにより生じた亜硝酸を利用するアナモックス反応が共存できたためと考えられた（図 1）。水素の添加量を増やした場合においても脱窒活性の上昇は見られず、また、亜硝酸およびアンモニア含有培地条件でのアナモックス反応への阻害効果も見られなかった。これらの結果から、水素は硝酸還元・アナモックス反応への電子供与体として適すると考えられたが、実際の農業現場で当該ガスの取り扱いは困難である。そこで、間接的に水素を供給する素材として鉄の検討をおこなった。

実験の結果、鉄の硝酸およびアンモニア含有培地への添加において、アナモックス活性が上昇する効果が見られた（図 2）。これは鉄の酸化反応により水素が生じたためと考えられた。しかし、一方で鉄の亜硝酸およびアンモニア含有培地への添加はアナモックス活性の低下をもたらした。さらに、当該条件では、脱窒反応に伴う亜酸化窒素が顕著に発生していること、また、培地中のアンモニアが増加していること、そして培地の pH が上昇している現象が見られた。

鉄が亜硝酸でのアナモックス活性を阻害する理由については明らかではないが、無生物的に鉄の酸化と亜硝酸の還元が生じたことによると考えられた。畜舎廃水の活性汚泥処理水は、その窒素形態が変化しやすく、環境

の変化によって一時的に亜硝酸が含まれる場合が多々あることから、硝酸還元・アナモックス反応への鉄の利用には、亜硝酸条件での阻害についてさらなる検討が必要であると言える。

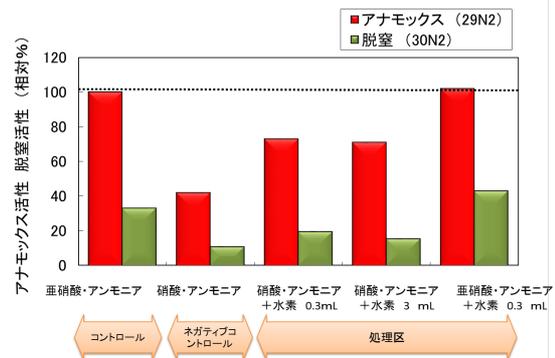


図 1 水素の硝酸還元・アナモックス反応への影響

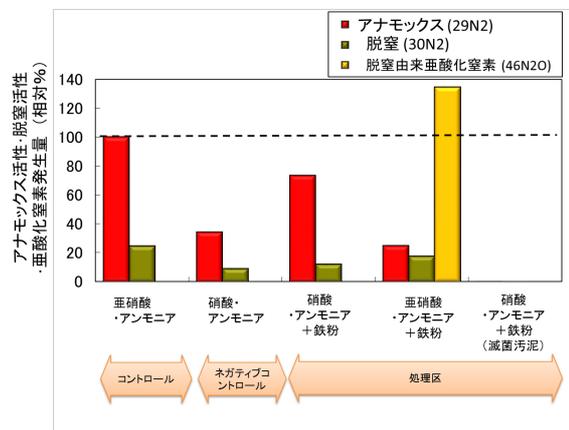


図 2 鉄の硝酸還元・アナモックス反応への影響

（2）農業現場由来電子供与体を用いた培養の結果、培養期間中の硝酸およびアンモニアの積算減少量はそれぞれ、イナワラ > モミガラ > オガクズ > コントロール、モミガラ > イナワラ、コントロール > オガクズ、であった。

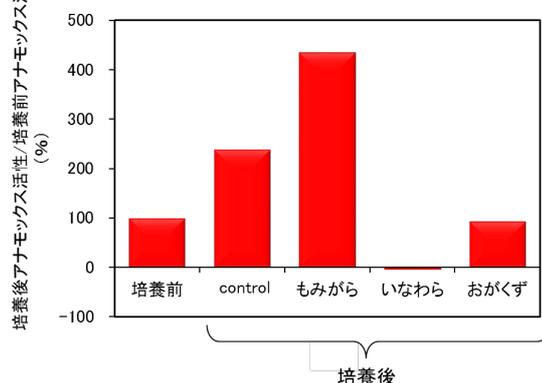


図 3 農業現場由来電子供与体の硝酸還元・アナモックス反応への影響

アナモックス活性は、モミガラ > 培養後コントロール > 培養前、オガクズ > イナワラ、の順であり(図3)。モミガラは培養によりアナモックス菌が増加し、またアンモニアの減少量から培養中におけるアナモックス反応による窒素除去が、試験条件の中で最大であったと考えられた。イナワラは、急激な硝酸の減少、枯渇、および pH の低下が見られ、アナモックス菌は死滅したと考えられた。オガクズは、アナモックス活性の変化が見られず、針葉樹による微生物増殖阻害がおこったと考えられた。以上のことから、モミガラが硝酸還元・アナモックス反応の電子供与体として利用可能であると考えられた。

(3) モミガラを用いた硝酸還元・アナモックス反応を確認するために、連続培養試験をおこなった。モミガラを添加する以前の15日間の培養では、アナモックス活性は培養前の約二倍にまで増加した。しかし、その後一方にモミガラを添加し約45日間培養を行った結果、リアクター中 MLVSS 濃度が低下し、処理水中の亜硝酸濃度が上昇し、汚泥中アナモックス活性は低下した(図4)。モミガラの添加により、汚泥の細分化が起こり流出し、また同時に従属栄養細菌の増加により汚泥あたりのアナモックス活性も低下したと考えられた。モミガラの添加量およびリアクターの形状について今後検討する必要がある。

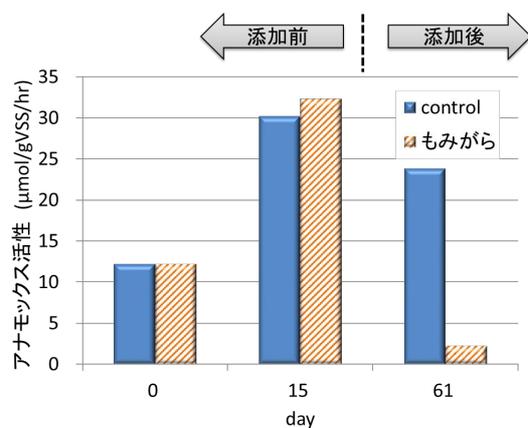


図4 連続培養試験におけるモミガラ添加の影響

#### <引用文献>

Kalyuzhnyi, S., Gladchenko, M., Mulder, A. and Versprille, B. 2006. DEAMOX - New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. *Water Research* 40(19), 3637-3645.

Strous, M., VanGerven, E., Zheng, P., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the

anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research* 31(8), 1955-1962.

Sumino, T., Isaka, K., Ikuta, H., Saiki, Y. and Yokota, T. 2006. Nitrogen removal from wastewater using simultaneous nitrate reduction and anaerobic ammonium oxidation in single reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(4), 346-351.

和木美代子, 安田知子, 福本泰之, 黒田和孝, 坂井隆宏, 鈴木直人, 鈴木良地, 松葉賢次, 鈴木一好 2010. 養豚廃水の活性汚泥処理施設から排出される窒素の特性. *水環境学会誌* 33(4), 33-39.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

和木美代子(2015)窒素を除去するアナモックス菌-畜産における可能性-, 畜産環境情報, 56, p1-14 (査読無し)

和木美代子(2014)畜産廃水処理施設に存在するアナモックス菌とその利用の可能性, 水環境学会誌 37(9), p325-328 (査読無し)

和木美代子(2013)畜産廃水のアナモックス処理-活性汚泥処理水への提供の可能性-, 畜産の研究 67(7), p751-756 (査読無し)

M. Waki, T. Yasuda, Y. Fukumoto, K. Kuroda, K. Suzuki (2012) Effect of electron donors on anammox coupling with nitrate reduction for removing nitrogen from nitrate and ammonium, *Bioresource Technology* (130) 592-598, doi:10.1016/j.biortech.2012.12.101(査読有り)

[学会発表](計 1 件)

和木美代子, 安田知子, 福本泰之, 鈴木一好, 黒田和孝(2012.11.25) 硝酸還元反応およびアナモックス反応による窒素除去への無機系電子供与体の影響, 水処理生物学会第49回大会、北里大学白金キャンパス(東京都) p66

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 和木 美代子 (WAKI, Miyoko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 畜産環境研究領域主任研究員

研究者番号: 10355092