3版

様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：８２１１１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６２９２１８５
研究課題名（和文）ハイブリッド伏流式人工湿地による窒素除去率向上のためのANAMMOX反応の活用

研究課題名（英文）Application of ANAMMOX reaction to improve nitrogen purification of hybrid subsurface flow constructed wetland systems

研究代表者
加藤　邦彦（Kunihiko, Kato）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター　生産環境研究領域・上級研究員

研究者番号：４０４５０３２４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,300,000円

研究成果の概要（和文）：畜産系有機汚水を浄化する実規模のハイブリッド伏流式人工湿地ろ過システム7施設において、処理水中の有機物濃度や形態別窒素濃度、アナモックス菌DNA濃度を調査した。その結果、アナモックス菌は、有機物が減少し、硝化により硝酸・亜硝酸とアンモニアが混在するシステム後段に多く、厳冬期には低減する傾向があることが判った。
アナモックス反応による窒素浄化を進めるには、処理水中の有機物濃度が低くなる人工湿地ろ過システムの後段において、処理水の一部を循環させることによりアンモニアと亜硝酸が共存する環境を整えることが好ましいと考えられた。ただし、極端な低温条件でははアナモックス反応が小さくなるという課題が残された。

研究成果の概要（英文）：We surveyed the anammox presence in the 7-full-scale hybrid type CWs treating wastewater from livestock farming or livestock products industry, and clarified the relationship between wastewater condition and anammox concentration. Anammox existed with relatively higher concentration in the CWs treating swine wastewater or dairy wastewater with the last bed with vertical flow or before the last bed with horizontal flow, where BOD and COD concentration were low and NO2- and NO3- concentrations were high. The high concentration of anammox DNA continued, however they dropped in winter season with air temperature drops less than zero. This study provides new and useful information to intensify nitrogen removal in hybrid CWs by adding anammox treatment.

研究分野：農業環境工学

キーワード：伏流式人工湿地　アナモックス　窒素削減　リアルタイムPCR　排水処理　水質浄化　硝化　脱窒

１．研究開始当初の背景

好気的な鉛直流ろ床と嫌気的な水平流ろ床を組合せた多段型のハイブリッド伏流式人工湿地ろ過システムは、高濃度の有機性排水を寒冷地でも通年浄化できる低コストの汚水処理法である。有機物によるろ床の目詰まりを回避するバイパス構造や軽量浮遊資材の活用、処理水を循環して再浄化する仕組みなどにより、従来よりも狭い面積で汚水を浄化できることを明らかにしてきた。2005 年以来、国内外 20 カ所以上で実規模の検証を行っている（例：図 1)。

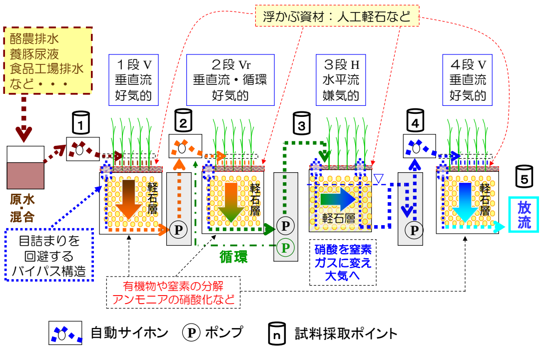

図 1　ハイブリッド伏流式人工湿地ろ過システムの流れ図（４段の例）

汚水中の窒素の浄化については、好気的ろ床における硝化（$NH_4 \rightarrow NO_3$）と嫌気的ろ床における脱窒（$NO_3 \rightarrow N_2$）の組合せにより、N_2 ガスとして窒素を低減する。しかし、処理の過程で炭素が減ると炭素窒素比（C/N 比）が減少して脱窒のための炭素源が不足するため、硝酸が残るという問題がある。特に元々C/N 比が低い養豚尿液などではこの問題が顕著になる（図 2)。

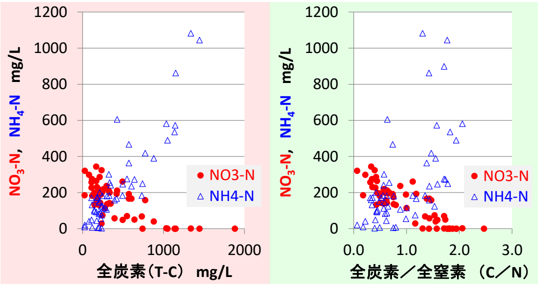

図 2　窒素の形態と炭素含量及び C/N の関係（人工湿地による養豚尿液処理の例：炭素が減る（C/N 低い）と硝酸が余る）

1990 年代に発見された ANAMMOX 反応（$NH_4 + NO_2 \rightarrow N_2 + 2H_2O$）は硝化過程または脱窒過程で発生する亜硝酸（$NO_2$）とアンモニア（$NH_4$）が共存する状態で進行する微生物反応であり、窒素除去のために電子供与体としての炭素源を必要としない。種々の機械的処理法（回分式、固定床、流動床、UASB リアクター等）では、窒素を効率的に削減する有望な手法として ANAMMOX 反応の研究開発が進んでいる。いっぽう人工湿地においても近年 ANAMMOX 反応の存在が明らかになりつつあるが、人工湿地のろ材や処理水の性状がどのような条件で ANAMMOX 反応が促進されるのかは殆ど明らかになっていない。

多段式のハイブリッド伏流式人工湿地では、処理の過程でアンモニアと亜硝酸が混在するろ床があり、ANAMMOX 反応を促進する条件を整えることにより、脱窒に炭素源を要しないで窒素浄化能力を向上できる可能性がある。

２．研究の目的

有機排水を処理するハイブリッド伏流式人工湿地ろ過システムにおいて、水質条件、処理ステージなどに応じて ANAMMOX 反応が促進される条件を解明する。それにより、ANAMMOX 反応を活用して効率的に窒素削減ができるハイブリッド伏流式人工湿地ろ過システムの開発に資する。

３．研究の方法

畜産系有機排水（豚舎排水、酪農雑排水、チーズ工場排水）を処理しているフルスケールのハイブリッド伏流式人工湿地７施設（表 1）において、ANAMMOX 反応が促進される条件を解明するため、以下の４つの課題に取り組んだ。

(1)ハイブリッド人工湿地の水質・水量・水温のモニタリング調査

各施設の全てのろ床の入口と出口において、形態別窒素含量（全窒素、硝酸、亜硝酸、アンモニア）、有機物濃度（BOD、CODCr）、懸濁物質（SS）、pH、酸化還元電位（ORP）などを分析した。また自動サイホンやポンプ槽に自記水位計と温度計を設置して、水位変動から処理流量と処理水温度をモニタリングした。また気温は最寄りの気象庁アメダスデータから入手した。

(2) 人工湿地ろ材のボーリング調査と流入・流出負荷の調査による窒素収支の定量化

豚舎汚水処理（施設Ｏ）および酪農雑排水処理（施設 S）においてボーリング調査試料の分析、及び、流入・流出負荷からの窒素収支解析の２つの手法で残留窒素量を解析し、気体として消失していると考えられる窒素の割合を評価した。

(3) リアルタイム PCR を用いた ANAMMOX 細菌数の定量解析による ANAMMOX 反応促進条件の解明

人工湿地７施設において、2014 年６月および８月に各施設の原水および各段から排出される処理水を採取し、サンプルから回収した SS 成分より DNA を抽出した後、ANAMMOX 細菌に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を用いて微生物濃度の定量解析を行った。さらに、ANAMMOX 細菌数の多かった豚舎汚水処理（施設Ｏ）および酪農雑排水処理

（施設Ｋ）について、2014 年 9 月、12 月および 2015 年 2 月に同様の調査を行った。
（※当初は人工湿地のろ過資材の ANAMMOX 活性を測定する計画で取り組んだが、ろ材の粒径が大きいためか、ANAMMOX 活性を実測することができなかった。そこで、次善の策として ANAMMOX 細菌数の定量解析に取り組んだ。）

(4) 窒素浄化効率を最適化する人工湿地ろ過システムの検討
　上記(1)～(3)の結果を踏まえて、ハイブリッド伏流式人工湿地ろ過システムの窒素浄化を最適化する設計手法を検討した。

表１　調査対象施設の人工湿地構成

施設名	汚水	人工湿地構成*
O	豚舎排水	1Vr - 2Vr - 3V - 4H - 5V
K	酪農雑排水	1V - 2Vr - 3H - 4V
S	酪農雑排水	1V - 2Vr - 3H
G	酪農雑排水	1V - 2V - 3V - 4H - 5V
E	酪農雑排水	1Vr
R	チーズ工場排水	1Vr - 2V - 3V - 4V
N	酪農雑排水＋チーズ工場廃水	1V - 2Vr - 3H - 4V

* 数値；段順位, V；鉛直流,　Vr；鉛直流＋循環, H；水平流

４．研究成果
(1)　水質・水量・水温の分析の結果、人工湿地ろ過システムによる有機物や窒素の浄化効率は 5～10 年間の長期にわたり、冬期も含めて安定していることが判った。外気温がマイナスとなる冬期においても、処理水温はマイナスとならず、厳冬期においてもシステムは凍結しないことが確認できた。

(2) ボーリング調査試料と物質収支の計算によるろ床に蓄積している窒素量を比較した結果、除去された窒素のうち、５～９割程度が人工湿地システムから気体として消失していることが判った。

(3) 7 施設の PCR データ解析の結果、汚水の有機物濃度（BOD や COD）が低く硝酸態窒素濃度が高いろ床（施設 O および K の最終段もしくはその前段）において、ANAMMOX 菌 DNA 濃度が高かった（図 3）。また、濃度の季節変動を継続して調査した結果、ANAMMOX 菌濃度は冬期に低下する傾向があった（図 4）。

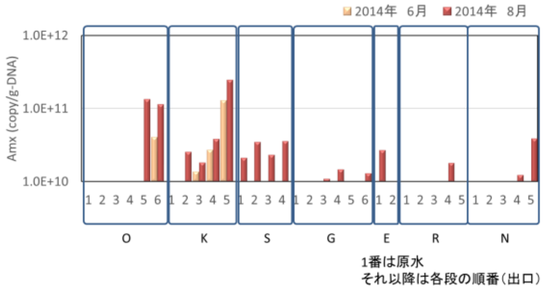

図３　サンプル中 ANAMMOX 菌 DNA 濃度

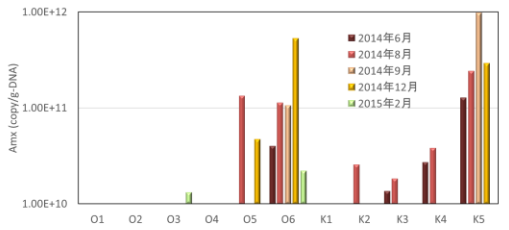

図４　施設 O および K における、サンプル中 ANAMMOX 菌 DNA 濃度の季節変動

(4)　窒素の物質収支と ANAMMOX 細菌数の解析の結果、システムにおける窒素浄化は主にシステムの前半におけるろ過作用による有機体窒素の除去、及び、硝化・脱窒の組合せにより気体の窒素として除去される割合が大きいと評価された。ANAMMOX 反応による窒素の除去は、有機物が減ってアンモニアと硝酸・亜硝酸が混在するシステム後段において進み、その浄化量は、物理的なろ過や硝化・脱窒と比べると小さいことが判った。
　ANAMMOX 反応を促進するには、処理水中の有機物濃度が小さくなる人工湿地ろ過システムの後段において処理水の一部を循環させることによりアンモニアと亜硝酸が共存する環境を整えることが好ましいと考えられた。また、極端な低温条件においてはその効果が小さくなるという課題が残された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計９件）

① Zhang X., Inoue T., Kato K., Izumoto H., Harada J., Wu D., Sakuragi H., Ietsugu H. and Sugawara Y. (2017) Multi-stage hybrid subsurface flow constructed wetlands for treating piggery and dairy wastewater in cold climate. Environmental Technology 38(2), 183-191, DOI: org/10.1080/09593330.2016.1187206（査読有）

② 加藤邦彦，井上京，家次秀浩，辻盛生（2017）伏流式人工湿地ろ過システムは畜産排水を冬期も含め長期間安定して浄化できる，畜産技術，(741)，22-27（査読無）

③ 加藤邦彦，井上京，家次秀浩，辻盛生，菅原保英，張暁萌，原田純，泉本隼人，青木和彦（2016）有機排水を冬期も含めて長期間安定して浄化できる多段型の伏流式人工湿地ろ過システム，日本土壌肥料学雑誌，87(6)，468-471（査読有）

④ J. Harada, T. Inoue, K. Kato, H. Izumoto, X. Zhang, H. Sakuragi, D. Wu, H. Ietsugu and Y. Sugawara (2016)

Long-term nitrogen compound removal trends of a hybrid subsurface constructed wetland treating milking parlor wastewater throughout its 7 years of operation. Water Science and Technology, 73(5) 1018-1024, DOI: 10.2166/wst.2015.568（査読有）

⑤ X. Zhang, T. Inoue, K. Kato, J. Harada, H. Izumoto, D. Wu, H. Sakuragi, H. Ietsugu, Y. Sugawara (2016) Performance of hybrid subsurface constructed wetland system for piggery wastewater treatment. Water Science and Technology 73(1) 13-20, DOI: 10.2166/wst.2015.457（査読有）

⑥ J. Harada, T. Inoue, K. Kato, N. Uraie, H. Sakuragi(2015) Performance evaluation of hybrid treatment wetland for six years of operation in cold climate. Environmental science and pollution research, 22(11) 12861-12869, DOI:10.1007/s11356-014-3843-2（査読有）

⑦ 辻 盛生，加藤邦彦，菊池福道，佐々木理史（2015）鶏舎洗卵所排水に適用した間欠鉛直流式人工湿地の開始 3 年間の浄化効果，水環境学会誌，38(5) 149-157（査読有）

⑧ 和木美代子（2015）窒素を除去するアナモックス金－畜産における可能性－，畜産技術情報，56，1-14（査読無）

⑨ 加藤邦彦，井上 京，家次秀浩，北川勝治,佐々木 仁（2014）高濃度有機性汚水を低コストで浄化処理できるハイブリッド伏流式人工湿地ろ過システム，畜産技術，709，17-20（査読無）

〔学会発表〕（計３２件）

① 加藤邦彦，井上 京，家次秀浩，辻 盛生，菅原保英，張 暁萌，泉本隼人，青木和彦，畜産排水を浄化する伏流式人工湿地ろ過システムの寒冷地における 5～10 年間の長期性能，第 51 回日本水環境学会年会，2017.3.17 熊本大学黒髪南キャンパス（熊本県・熊本市）

② 和木美代子，廃水処理への新規窒素変換微生物 ANAMMOX 菌の利用，第 34 回 土・水研究会，2017.2.27 つくば農林ホール（茨城県・つくば市）

③ 和木美代子,阿部 薫,安田知子,福本泰之,加藤邦彦,青木和彦,菅原保英,井上 京,原田 純,張 暁萌,泉本隼人,家次秀浩,人工湿地とアナモックス反応の組み合わせによる窒素除去の可能性，第 11 回人工湿地ワークショップ，2016.9.27，いわて県民情報交流センター（岩手県・盛岡市）

④ Zhang X.，Kato K.，Inoue T.，Ietsugu H. and Sugawara Y.，Dynamics and balance of nitrogen in hybrid subsurface flow constructed wetland，第 11 回人工湿地ワークショップ，2016.9.27，いわて県民情報交流センター（岩手県・盛岡市）

⑤ 加藤邦彦，畜産系有機排水を浄化する伏流式人工湿地ろ過システムの紹介，第11 回人工湿地ワークショップ，2016.9.27，いわて県民情報交流センター（岩手県・盛岡市）

⑥ Kato K.，Inoue T.，Ietsugu H.，Sugawara Y.，Zhang X. and Izumoto H.，Estimation of seasonal and annual change of treatment performance with reference to temperature dependency for multistage hybrid wetland systems treating swine and dairy wastewater, 15th IWA International Conference on WEtland Systems for Water Pollution Control，2016.9.5 Gdansk（Poland）

⑦ Zhang X.，Kato K.，Inoue T.，Izumoto H.，Harada J.，Ietsugu H. and Sugawara Y.，Nitrogen balance of hybrid subsurface flow constructed wetland treating livestock waste water, 15th IWA International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, 2016.9.5 Gdansk（Poland）

⑧ 加藤邦彦，井上 京，家次秀浩，辻 盛生，菅原保英，張 暁萌,泉本隼人,青木和彦,工藤一晃,戸上和樹,三浦憲蔵，有機性排水を浄化する多段型伏流式人工湿地ろ過システムの季節・経年安定性，日本土壌肥料学会東北支部会，2016.7.5 山形大学農学部（山形県・鶴岡市）

⑨ 和木美代子，安田知子，福本泰之，加藤邦彦，青木和彦，井上 京，原田 純，張 暁萌，泉本隼人，家次秀浩，菅原保英，畜産系有機性排水を浄化するハイブリッド伏流式人工湿地におけるアナモックス菌の季節変動，第 50 回日本水環境学会年会，2016.3.17 アスティとくしま（徳

島県・徳島市）

⑩ 加藤邦彦，井上京，家次秀浩，菅原保英，張 暁萌，泉本隼人，青木和彦，畜産排水を浄化する多段型ハイブリッド伏流式人工湿地の処理水質の推定と温度依存性，第 50 回日本水環境学会年会，2016.3.17 アスティとくしま（徳島県・徳島市）

⑪ X. Zhang, T. Inoue, K. Kato, J. Harada, H. Izumoto, H. Ietsugu and Y. Sugawara, Performance of hybrid constructed wetland systems for high content wastewater treatment in cold climate, 6th International Symposium on Wetland Pollutant Dynamics and Control, 2015.9.18, York (United Kingdom)

⑫ Kunihiko Kato, Takashi Inoue, Hidehiro Ietsugu, Yasuhide Sugawara, June Harada, Xiaomeng Zhang and Hayato Izumoto, Estimation of seasonal change of treatment performance by adjusting temperature coefficient for hybrid wetland systems treating agricultural wastewater in cold climate, 6th International Symposium on Wetland Pollutant Dynamics and Control, 2015.9.18, York (United Kingdom)

⑬ T. Inoue, H. Izumoto, K. Kato, X. Zhang, J. Harada, H. Ietsugu and Y. Sugawarae, Phosphorus removal in three full-scale hybrid subsurface constructed wetland systems, 6th International Symposium on Wetland Pollutant Dynamics and Control, 2015.9.17, York (United Kingdom)

⑭ 加藤邦彦，井上 京，家次秀浩，菅原保英,張 暁萌，泉本隼人，青木和彦，戸上和樹,工藤一晃，三浦憲蔵，ハイブリッド伏流式人工湿地ろ過システムにおけるリン浄化機能の持続性と強化策，第 61 回日本土壌肥料学会、2015.9.11　京都大学吉田キャンパス（京都府・京都市）

⑮ 泉本隼人，井上 京，加藤邦彦，原田 純，張 暁萌，家次秀浩，菅原保英，３つの実規模ハイブリッド伏流式人工湿地におけるリン除去特性，平成 27 年度農業農村工学会，2015.9.3 岡山大学津島キャンパス（岡山県・岡山市）

⑯ X. Zhang, T. Inoue, H. Izumoto and K. Kato, Assessment of treatment efficiency of Hybrid Subsurface Constructed Wetland systems and the factoraffecting its efficiency，第 10 回人工湿地ワークショップ，2015.8.27 中標津町総合文化会館しるべっと（北海道・中標津町）

⑰ 泉本隼人，井上 京，張 曉萌，加藤邦彦，ハイブリッド伏流式人工湿地におけるリンの形態別浄化特性，第 10 回人工湿地ワークショップ，2015.8.27 中標津町総合文化会館しるべっと（北海道・中標津町）

⑱ 加藤邦彦，伏流式人工湿地浄化法 10 年間の歩みと排水処理用人工湿地マニュアルの準備，第 10 回人工湿地ワークショップ，2015.8.27 中標津町総合文化会館しるべっと（北海道・中標津町）

⑲ 加藤邦彦，井上 京，家次秀浩，辻 盛生，菅原保英，張 暁萌，泉本隼人，青木和彦，戸上和樹，工藤一晃，三浦憲蔵，岡 紀邦，有機性排水を浄化する多段型伏流式人工湿地ろ過システムの処理効果と設計・管理方法，2015 年度日本土壌肥料学会東北支部大会，2015.7.6 カレッジプラザ（秋田県・秋田市）

⑳ X. Zhang, T. Inoue, K. Kato, J. Harada, H. Izumoto, D. Wu, H. Sakuragi, H. Ietsugu and Y. Sugawara, Performance of hybrid constructed wetland system for piggery wastewater treatment, 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries, 2014.11.25 ザクラウンパレス新阪急高知（高知県・高知市）

㉑ J. Harada, T. Inoue, K. Kato, H. Izumoto, X. Zhang, H. Sakuragi D. Wu, H. Ietsugu and Y. Sugawara, Long term nitrogen compound removal trend of a hybrid subsurface constructed wetland treating milking parlour wastewater throughout its seven years of operation, 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries, 2014.11.25 ザクラウンパレス新阪急高知（高知県・高知市）

㉒ 和木美代子,安田知子,福本泰之,菅原保英,青木和彦,加藤邦彦,原田 純,張 暁萌,泉本隼人,井上 京,家次秀浩，畜産系有機性排水を浄化するハイブリッド伏流式人工湿地におけるアナモックス菌の分布，

第51回水処理生物学会大会，2014.11.13 山梨大学（山梨県・甲府市）

㉓ Xiaomeng Zhang, Takashi Inoue, June Harada, Hayato Izumoto, Kunihiko Kato, Hidehiro Ietsugu and Yasuhide Sugawara, Pollutant removal in hybrid constructed wetland for piggery wastewater treatment in cold climate region, 農業農村工学会北海道支部 第63回研究発表会，2014.10.29 札幌エルプラザ（北海道・札幌市）

㉔ 原田 純，井上 京，加藤邦彦，張 暁萌，泉本隼人，家次秀浩，菅原保英，ハイブリッド伏流式人工湿地における溶存態窒素の浄化メカニズム，農業農村工学会北海道支部 第63回研究発表会，2014.10.29 札幌エルプラザ（北海道・札幌市）

㉕ 泉本隼人，井上 京，加藤邦彦，原田 純，張 暁萌，家次秀浩，菅原保英，ハイブリッド伏流式人工湿地におけるリンの除去特性，農業農村工学会北海道支部 第63回研究発表会，2014.10.29 札幌エルプラザ（北海道・札幌市）

㉖ Kunihiko Kato, Takashi Inoue, Hidehiro Ietsugu, Yasuhide Sugawara, June Harada, Katsuji Kitagawa, Hitoshi Sasaki, Hiroaki Sakuragi, Kazuhiko Aoki and Kenzo Miura, Performance and cost evaluation of hybrid wetland systems for organic wastewater treatment in Hokkaido, northern Japan, 14th International Conference, Wetland Systems for Water Pollution Control, 2014.10.14 Shanghai (China)

㉗ 加藤邦彦，井上 京，家次秀浩，菅原保英，原田 純，泉本隼人，張 暁萌，北川勝治，青木和彦，三浦憲蔵，有機性汚水を浄化する伏流式人工湿地ろ過システムの処理水質変動予測手法の検討，第60回日本土壌肥料学会，2014.9.11 東京農工大学小金井キャンパス（東京都・小金井市）

㉘ 加藤邦彦，井上 京，原田 純，泉本隼人，張 暁萌，家次秀浩，菅原保英，辻 盛生，和木美代子，酪農・畜産・食品工場などの有機性汚水を省エネルギーに浄化処理する伏流式人工湿地ろ過システム －仕組み、効果、設計、コストについて－，第17回日本水環境学会シンポジウム、2014.9.8 滋賀県立大学（滋賀県・彦根市）

㉙ J. Harada, T. Inoue, X. Zhang, H. Izumoto and K. Kato, Analysys of changes and removal of nitrogen pollutant in hybrid subsurface constructed wetland, 第９回人工湿地ワークショップ，2014.8.29 東北工業大学一番町ロビー（宮城県・仙台市）

㉚ 泉本隼人，井上 京，原田 純，張 暁萌，加藤邦彦，ハイブリッド人工湿地によるリン除去特性，第９回人工湿地ワークショップ，2014.8.29 東北工業大学一番町ロビー（宮城県・仙台市）

㉛ X. Zhang, T. Inoue, J. Harada, H. Izumoto and K. Kato, Nitrogen removal in hybrid constructed wetland system for piggery wastewater treatment, 第９回人工湿地ワークショップ，2014.8.29 東北工業大学一番町ロビー（宮城県・仙台市）

㉜ 加藤邦彦，井上 京，家次秀浩，菅原保英，原田 純，泉本隼人，張 暁萌，岡 紀邦，青木和彦，戸上和樹，工藤一晃，三浦憲蔵，有機性汚水を浄化する伏流式人工湿地ろ過システムの処理効果と経済性の評価，日本土壌肥料学会東北支部大会，2014.7.8 東北大学（宮城県・仙台市）

〔その他〕
Researchmap-加藤邦彦-
http://researchmap.jp/katokuni/

人工湿地ネットワーク Constructed Wetland Network
http://treatmentwetlandnet.blog.fc2.com/

６．研究組織
(1)研究代表者
加藤 邦彦（KATO, Kunihiko）
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター 生産環境研究領域・上級研究員
研究者番号：４０４５０３２４

(2)研究分担者
和木 美代子（WAKI, Miyoko）
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 畜産環境研究領域・上級研究員
研究者番号：１０３５５０９２

井上 京（INOUE, Takashi）
国立大学法人北海道大学・農学研究院・教授
研究者番号：３０２０３２３５