

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07817

研究課題名(和文) 水質浄化システムにおける植生とANAMMOX菌等窒素代謝微生物の関係解明

研究課題名(英文) Relationship between vegetation and N transformation microbe like ANAMMOX in the wastewater treatment system

研究代表者

阿部 薫 (Abe, Kaoru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・研究領域長

研究者番号：70355551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：人工湿地におけるANAMMOX反応の利用を目指し、植生、濾床、汚水の流入等とANAMMOX菌等の関係を解析した。土壌人工湿地に於いて、表面流に比べ浸透流では窒素浄化機能が高く推移し、また、ANAMMOX菌数には異なる傾向が認められた。ラボスケールのゼオライト濾床人工湿地において、流入濃度を変化させてもゼオライトのアンモニアの吸着・再溶出によりANAMMOX反応が起こった。一方、流入濃度一定のパイロットスケールのゼオライト濾床人工湿地では、濾床内は硝化が優先する環境となりANAMMOX反応は進まず、植生根からの有機物供給による還元条件の形成や基質アンモニアの供給制限などが原因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The relationship between ANAMMOX bacteria and vegetation, filter beds, wastewater feed was analyzed in order to utilize the ANAMMOX reaction in constructed wetlands. In the soil wetland, the nitrogen purification function remained high in the subsurface flow compared with the surface flow, and a different tendency was observed in the number of ANAMMOX bacteria in both flow. In a lab scale zeolite constructed wetland, ANAMMOX reaction proceeded by adsorption/re-elution of ammonia of zeolite even if the inflow concentration was changed. On the other hand, in a pilot scale zeolite constructed wetland with a constant inflow concentration, nitrification takes precedence in the filter bed, the ANAMMOX reaction did not proceed. It was likely because formation of reducing conditions due to organic matter supply from vegetation roots, restriction on the supply of substrate ammonia, etc.

研究分野：環境農学

キーワード：人工湿地 植生 ANAMMOX アナモックス 窒素代謝微生物

1. 研究開始当初の背景

湿地生態系における植生や土壌粒子、土壌微生物などの機能（栄養塩類の吸着・吸収、窒素代謝、有機物分解など）を活用した水質浄化法は、省エネルギー・低コストの浄化法として注目されている。特に人工湿地法は、世界的に利用され、我が国でも、有機性汚濁や栄養塩類除去の目的で河川、畜産系排水、浄化槽放流水などへの適用が認められる (Vymazal, 2007, Abe et al. 2014)。窒素除去のメカニズムについては、湿地植生による吸収、土壌粒子への吸着なども 2-3 割程度の寄与があるが (Abe et al. 2014 他)、土壌微生物による硝化 - 脱窒のプロセスが最も重要と考えられている (Vymazal, 2007)。

近年、従来の硝化 - 脱窒とは異なる嫌氣的アンモニウム酸化 (Anaerobic Ammonium Oxidation: ANAMMOX) という新規の窒素除去プロセスが、オランダの排水処理プラントで発見され、デルフト工科大学の研究グループにより報告されている (Mulder et al., 1995)。この反応は、図 1 に示すように、アンモニウムイオンと亜硝酸イオンから窒素ガスを生じるもので ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 +$

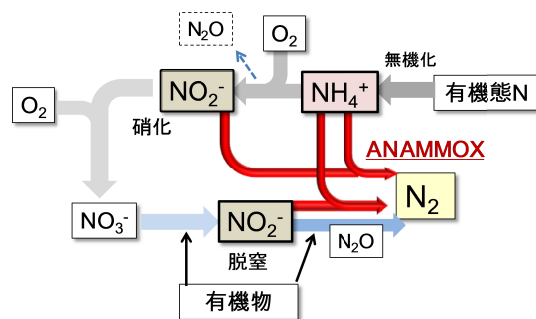


図 1. 窒素サイクルと ANAMMOX 反応

$2\text{H}_2\text{O}$)、Planctomycetes 門に属する絶対嫌気性独立栄養細菌により担われる新規な窒素サイクルである。アンモニアを硝酸まで酸化する必要がないため酸素供給量を半減できる、脱窒の水素供与体添加が不要、一酸化二窒素を発生しない等のメリットから、排水処理分野において研究が精力的に行われ (Waki 2010 他)、実用の排水処理プラントも開発されている。

排水処理施設での発見の後、ANAMMOX 細菌の自然界における生息場所をさぐる研究が進み、海洋の窒素サイクルにおける重要性が指摘されている。陸域生態系についても、富栄養化した湖の底泥や水面と陸地の境界面付近などにおいて、脱窒に比べ ANAMMOX 反応による窒素除去の寄与が高い領域が見いだされるとともに、人工湿地における ANAMMOX 反応の存在を示す論文が報告されるようになり、無視できない役割を担っていると考えられる (Erler et al., 2008, Yoshinaga et al., 2011, Zhu et al. 2013)。

しかしながら、湿地生態系における ANAMMOX 細菌の生息環境や影響する環境条件、

共存する窒素代謝微生物との関係性や反応基質となる亜硝酸の供給経路については、殆ど未解明であり、植物根圏における ANAMMOX 細菌の生息に関する知見はほとんど無い。

著者等は、浄化槽放流水が流入する表面流人工湿地において、ANAMMOX 活性の湿地土壌内の分布を 15N 標識スラリー培養法により調査し、表層 2cm が最も高いとの結果を得た。さらに、流入口からの距離、湛水状況、植生 (マコモ) の有無などの環境条件の異なる地点での調査を併せて実施したところ、流入口近傍の湛水しやすく含水率の高い地点での活性が高く、また、亜硝酸性窒素濃度と有意な相関のあることが明らかとなった。

ANAMMOX 反応の基質を含む浄化槽放流水が連続的に供給されることと、亜硝酸イオンが集積しやすい適度な還元条件が重要と考えられた。また、同じように湛水している地点でも、植生のある地点の活性が植生のない地点に比べ高い傾向を見出している。さらに、DNA クローン解析の結果、もともと当該湿地にいた ANAMMOX 菌が活性を示している可能性が高いと考えられた (Waki et al., 2015)。

2. 研究の目的

流入水や湿地土壌中の亜硝酸態窒素濃度は低く、硝化や脱窒の途上で生じる亜硝酸イオンが、ANAMMOX 反応の律速になっていると考えられ、これら窒素代謝に関する微生物反応との関係性やその制御が、ANAMMOX 反応の促進に重要な意味を持つと予測される。湿地植生である抽水植物は地上部から根茎に酸素を輸送する通気組織を有し、根近傍は酸化的であるがその外は還元的な嫌気好気的なモザイク構造を有することが知られている。この湿地植生特有の根圏環境や根から分泌される有機物等は、他の窒素代謝微生物と ANAMMOX 菌との関係に何らかの影響を与えている可能性がある。

土壌のある人工湿地と非土壌の水耕栽培方式では酸素供給や酸化還元電位の違いから、異なる亜硝酸供給経路が予想された。そこで本研究においては、土壌を用いた小型人工湿地および、土壌を用いない水耕栽培型水質浄化システムを用いて、植生、土壌、汚水の流入条件等と ANAMMOX を含む窒素代謝微生物の関係を解明し、植生導入型の水質浄化システムにおける ANAMMOX の積極的利用のための基礎的知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 土壌を用いる人工湿地システム - 汚水流下法の影響 -

人工湿地は表面流と浸透流で基質の到達や還元状態等、植物根系の環境が異なると予想されることから、これら二つの環境の人工湿地を用いて調査・比較した。

[人工湿地] 図 2 に示すパイロットスケールの人工湿地 (0.5m²) にマコモ (*Zizania latifolia* L.) を栽植し、年間表面流で管

理した後、ANAMMOX 順養土壌（各 2L）を人工湿地の表面に添加し、片方の湿地の流入条件を浸透流で管理した。人工汚水 $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ を等量含むを定量的（約 10-20 mm/d）に供給した。

[窒素等浄化機能] 流入水、流出水の水量、形態別窒素濃度、各種イオン濃度を毎週測定し、不定期で湿地内土壌の間隙水の水質を測定した。土壌の埋設白金電極による酸化還元電位等を適宜調査した。また、約 10 cm 深までの土壌コアを各 3 点採取し、0 ~ -2cm、-2 ~ -5cm、-5 ~ -10cm 土壌の KCl 抽出形態別窒素濃度を測定した。

[窒素代謝微生物] 深さ別土壌について、土壌から total DNA を抽出した後、ANAMMOX 菌、アンモニア酸化細菌の DNA 濃度を定量した。

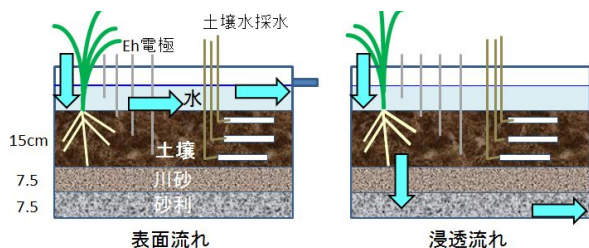


図2 小型人工湿地と排水流下条件

(2) 土壌を用いない人工湿地システム - ゼオライト濾床の人工湿地 - (ラボスケール)

[ゼオライトのイオン交換能]

ゼオライトのイオン交換による収支を確認するため、培養を行った。ポリスチレン性のビーカーに、ゼオライト（クリノプチロライト、イオン交換容量 170mgEq/100g）1g と養豚廃水の活性汚泥処理水 80 mL 入れ、ゼオライトを壊さないよう、スターラーで緩やかに攪拌しながら室温で 24 時間培養した。培養前後の NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の濃度をイオンクロマトグラフによって測定した。

[ゼオライト濾床浸透流れ人工湿地の運転]

有効容積 290 mL のカラム型リアクターにイオン交換能測定に用いたものと同じゼオライトを 250mL 封入し、浸透流れとし、水位はゼオライトの高さとほぼ同じとした。カラムには、アナモックス菌を高濃度に含むバイオフィームを 5g 添加した。畜産廃水の活性汚泥処理水に NH_4Cl もしくは NaNO_2 を後述の濃度になるよう添加し、さらに添加した窒素と当モルの NaHCO_3 をも添加した。1-1.5 ヶ月の間隔で、流入水中窒素濃度を $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 300 mg/L (Run I) , $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 100 mg/L (Run II) , $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 300 mg/L (Run III) , $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 100 mg/L (Run IV) , $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 300 mg/L (Run V) と なるように変化させ、ゼオライトの上部から 1 時間毎に 10mL 散水した。ゼオライトに吸着されたアンモニアの量は Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、

Ca^{2+} の増加量から推定した。また実験終了後に汚泥から DNA を抽出し、アナモックス菌、アンモニア酸化細菌、アンモニア酸化古細菌の DNA 濃度について定量した。

(3) 土壌を用いない人工湿地システム - ゼオライト濾床人工湿地 - (パイロットスケール)

ゼオライト（粒径 3-5 mm ; CEC 170 cmolc/kg）17 kg を濾床として充填した横浸透流れの人工湿地（0.6×0.41×0.15 m）を 2 基作成し、2017/6/15 にアナモックス汚泥 30g を各人工湿地に投入、ゼオライトと混和した。流入から流出口に向かって濾床内 3カ所に Eh センサーと有孔管を設置し、6/20 に片方の湿地にマコモ 2 株を移植した（図 3）。有機性排水の二次処理水を模した人工汚水（ $\text{NH}_4\text{-N}$ 33.8、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 32.1 mg/L 他）を定量的（約 8L/d; 320 mm/d）に供給し、流入・流出水量と水質を測定した。11/16 にゼオライトを採取し、total DNA を抽出した後、リアルタイム PCR によりアナモックス菌、アンモニア酸化細菌、アンモニア酸化古細菌、亜硝酸酸化細菌（Nitrospira, Nitrobacter）、真正細菌の DNA 濃度を定量した。

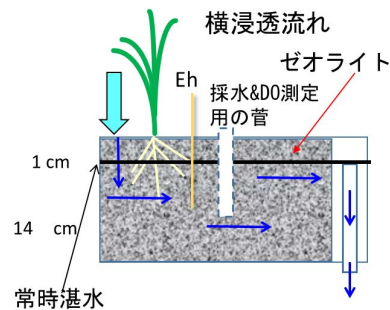


図3 ゼオライト濾床人工湿地

4. 研究成果

(1) 土壌を用いる人工湿地システム - 汚水流下法の影響 -

人工湿地を浸透流に切り替えると速やかに窒素流出速度は減少し、以降も表面流で管理し続けた人工湿地に比べ低く（除去速度は高く）維持された（図 4）。浸透流切り替え後最初の冬は、表面流湿地の 1/2-1/4 の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度・流出速度、約 1/10 の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度・流出速度で推移した。浸透流により、冬場植生に吸収されない窒素のうち $\text{NH}_4\text{-N}$ は土壌への吸着により、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は脱窒等により除去されたと考えられる。流入量が増大した翌年の冬には、流出量も増加しているが、これは土壌の $\text{NH}_4\text{-N}$ 吸着サイトの飽和やバイパス流などによるものと考えられた。

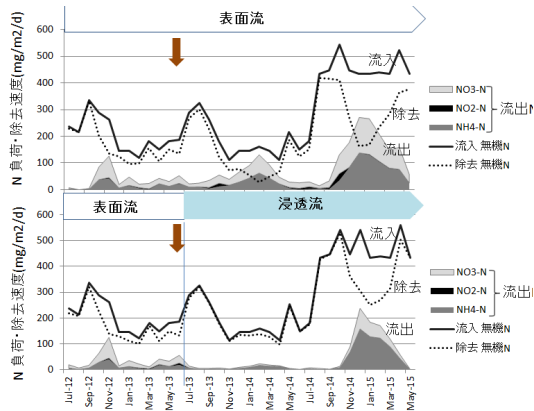


図4. 人工湿地への無機窒素流入、除去、流出速度

浸透流切り替え1年2ヶ月後に湿地内土壌を3箇所ずつ採取し、深さ別(0~-2、-2~-5、-5~-10cm)に、形態別窒素濃度、窒素代謝微生物DNAの調査を実施した。形態別窒素濃度は表層が高い傾向にあり、表面流湿地と浸透流切り替え湿地で大きな傾向の違いは認められなかった。窒素代謝微生物のDNAについては、アンモニア酸化細菌については両方の湿地において表層で高い傾向にあったのに対し、ANAMMOX菌は、表面流湿地では深さ別で顕著な傾向は認められなかったが、浸透流切り替え湿地では下層(-5~-10cm)が高かった。

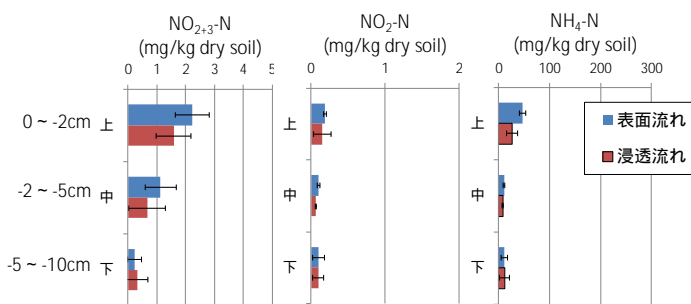


図5 湿地土壌の形態別無機態窒素濃度

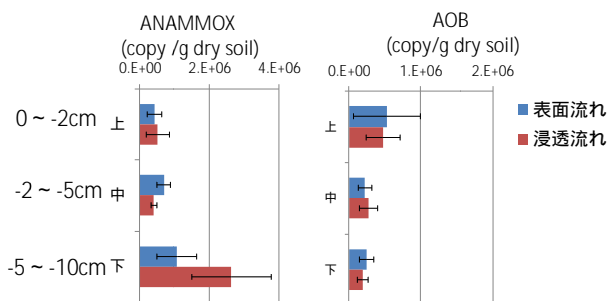


図6 湿地土壌のANAMMOX菌とアンモニア酸化細菌DNAの分布

(2) 土壌を用いない人工湿地システム - ゼオライト濾床の人工湿地(ラボスケール) -
 ゼオライトのイオン交換能を確認するための培養を行った結果、培養によって、 NH_4^+ と K^+ の濃度は減少し、 Na^+ 濃度は大きく上昇、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} のイオン濃度は若干上昇した。培養の前でイオン当量濃度の合計がほぼ一致したことから(図7)、 NH_4^+ と K^+ がゼオライトに吸着される時、その他のイオンが溶出していることが確認された。

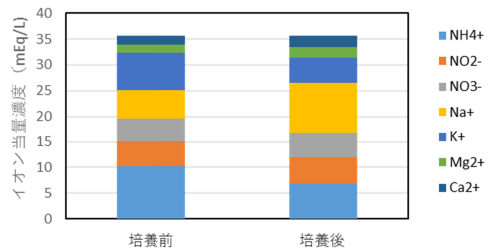


図7 培養前後のイオン当量濃度

カラムに添加したバイオフィームはアナモックス反応により一日当たり、90 mgの窒素を除去できる量であることから、リアクターはすでにアナモックス菌が集積されているとみなした。各条件での処理水中窒素濃度は、流入水濃度より低いものであった(図8)。Run I では運転初期において処理水は32 mg/Lのアンモニア態窒素を含んでいたが徐々にアンモニア濃度が上昇し、55日めに151 mg/Lとなった。処理水には平均22 mg/Lの硝酸が含まれていた。流入水に含まれるBODは110 mg/Lであった。Run Iにおける窒素除去は、ゼオライトへのアンモニアの吸着、アンモニア酸化・アナモックス、硝化・脱窒、の複数の反応により起こったと考えられた。Run II では、流入水には亜硝酸のみが含まれるにもかかわらず、処理水中の窒素濃度は流入水より低く、アンモニアも含まれていたことから、ゼオライトに吸着していたアンモニアが溶出し、それを用いたアナモックス反応が起こったと考えられた。Run IIIの運転初期においては、Run Iの終了時より処理水中窒素濃度が低く、Run IIでアンモニアが溶出することにより吸着能が回復したと考えられた。Run IVの流入水の亜硝酸/アンモニア比は1.0で、アナモックス反応にはある程度適しているが、アンモニアが若干不足している。Run II同様、アナモックス反応の一部にゼオライトから溶出したアンモニアが使われたと考えられた。Run Vの運転初期においても、Run I, IIの運転終了時より処理水中の窒素濃度が低く、Run IVでのアンモニアの溶出により、吸着能が回復したと考えられた。

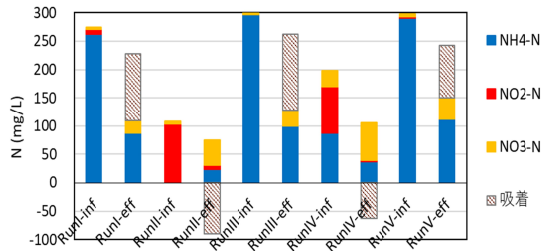


図 8 各流入水条件での流入水中および処理水中窒素濃度および推定アンモニア吸着濃度の平均値

リアルタイム PCR による定量解析の結果、アナモックス菌の DNA 濃度は種汚泥と試験後の汚泥中濃度で同レベルであった(表 1)。アンモニア酸化細菌は、種汚泥中ではアナモックス菌の 1/100 レベルであったものが、試験後はアナモックス菌と同じレベルにまで増加しており、アンモニアのみが流入する期間において増加し、アナモックス菌に亜硝酸を供給していたものと推測された。アンモニア酸化古細菌の濃度はアナモックス菌に比べて 1/10000 以下であり、本システムにおいてはほとんど寄与がないことが確認された。

表 1 培養前後の汚泥中のアナモックス菌、アンモニア酸化細菌、アンモニア酸化古細菌の DNA 濃度

		培養前種汚泥	培養後汚泥
アナモックス菌	copy/g-DNA	4.22E+14	2.34E+14
アンモニア酸化細菌	copy/g-DNA	2.8E+12	1.214E+14
アンモニア酸化古細菌	copy/g-DNA	9.4E+09	8.0E+09

3) 土壌を用いない人工湿地システム - ゼオライト濾床の人工湿地(パイロットスケール) -

流出水の無機窒素濃度や流出量の推移は、9月までは、植生有と無の人工湿地で大きな差は無く、NH₄-N はほとんど流出しないが、NO₂+3-N は流入と同量かそれを上回る流出があった。マコモがある程度繁茂した 10 月は、植生区では NO₂+3-N 流出量が流入量より約 17% 少なくなった(図 9)。ゼオライト濾床中の NH₄-N 濃度は日数の経過とともに流入口近くより上昇し、吸着サイトが徐々に飽和してきたものと考えられる(図 10)。

ゼオライト濾床中の窒素代謝微生物は、両湿地ともアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌が同程度に存在し、アナモックス菌はその 1/10 以下であった(図 11)。

期待した植物根からの有機物供給による還元環境の創出が実験期間中にできず(マコ

モの生育不足)濾床内が硝化の優先する好気的環境であったこと、また基質である NH₄⁺ の供給が濾床内で限定されたことなどが、アナモックス反応が進まなかった原因と考えられた。

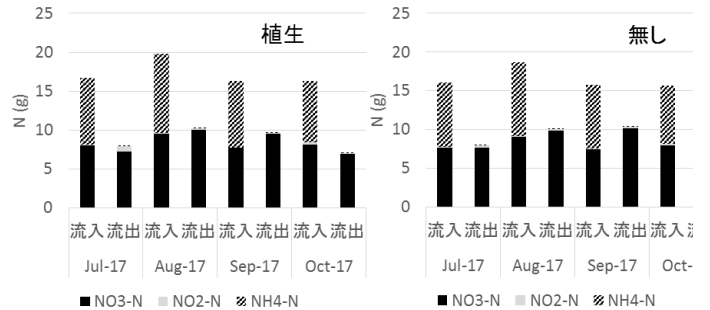


図 9 形態別窒素流入量と流出量

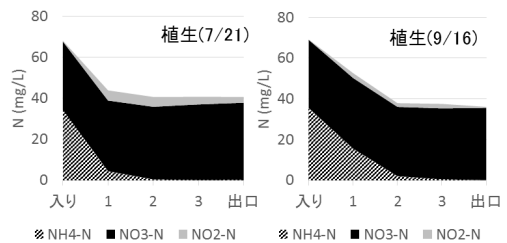


図 10 植生有り濾床内の形態別窒素濃度

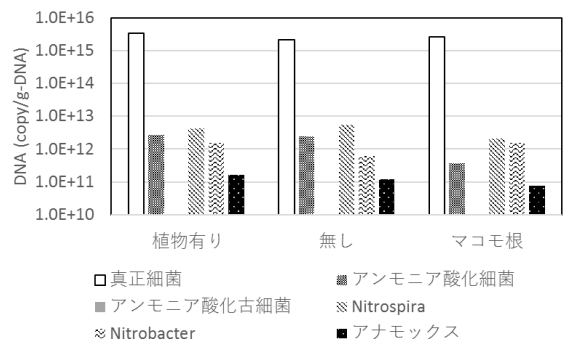


図 11 濾床内の微生物 DNA 量

4) まとめ

(1) 土壌人工湿地システムに於いて、表面流に比べ浸透流では窒素浄化機能が高く推移したが、土壌中の形態別窒素濃度に顕著な差は認められなかった。ANAMMOX 菌数には異なる傾向が認められた。

(2) ラボスケールのゼオライト濾床人工湿地において、濾床内ではアナモックス菌が高濃度に保持され、流入基質濃度を変化させてもゼオライトのアンモニアの吸着・溶出によるアナモックス反応が起こった。

(3) 流入水濃度一定のパイロットスケールゼオライト濾床人工湿地において、濾床内は硝化が優先する環境となりアナモックス反応

は十分進まなかった。

<引用文献>

- Abe, K., Komada, M., Ookuma, A., Itahashi, S., Banzai, K. Purification performance of a shallow free-water-surface constructed wetland receiving secondary effluent for about 5 years. *ECOLOGICAL ENGINEERING*, 69, 126-133 (2014).
- Vymazal, J., Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Sci Total Environ.* 380, 48-65. (2007).
- Mulder, A., Van de Graaf, A.A., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G.: Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(3), 177-184 (1995).
- Waki Met. al. Rate determination and distribution of anammox activity in activated sludge treating swine wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 2685-2690 (2010).
- Erlor D. V., Eyre B. D., and Davison L. The Contribution of Anammox and Denitrification to Sediment N₂ Production in a Surface Flow Constructed Wetland. *Environ. Sci. Technol.* 42, 9144-9152 (2008).
- Yoshinaga I., Amano T., Yamagishi T., Okada K., Ueda S., Sako Y., and Suwa, Y. Distribution and Diversity of Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) Bacteria in the Sediment of a Eutrophic Freshwater Lake, Lake Kitaura, Japan. *Microbes Environ.* 26, No. 3, 189-197 (2011).
- Zhu, G.B., Wang, S.Y., Wang, W.D., Wang, Y., Zhou, L.L., Jiang, B., Op den Camp, H.J.M., Risgaard-Petersen, N., Schwark, L., Peng, Y.Z., Hefting, M.M., Jetten, M.S.M., Yin, C.Q. Hotspots of anaerobic ammonium oxidation at land-freshwater interfaces. *Nature Geoscience*, 6(2), 103-107 (2013).
- Waki, M., Yasuda, T., Suzuki, K., Komada, M., Abe K. Distribution of anammox bacteria in a free-water-surface constructed wetland with wild rice (*Zizania latifolia*). *ECOLOGICAL ENGINEERING*, 81, 165-172 (2015).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

和木 美代子 (2016) アナモックス反応による窒素処理とその畜産排水処理における利用の可能性、*Pig Journal*、査

読無、19(7)、35-37、2016.07.

[学会発表](計 8件)

- 阿部 薫,和木 美代子,駒田 充生(2018) 吸着資材利用人工湿地における窒素動態、第52回日本水環境学会年会講演集、571
- 阿部 薫、駒田 充生、和木 美代子(2017) 機能炭を用いた人工湿地における窒素浄化、日本土壌肥料学会講演要旨集 第63集、159
- 阿部 薫、駒田 充生、和木 美代子 (2017) 機能炭濾床人工湿地の窒素収支、第12回人工湿地ワークショップ 2017 in 上川(美瑛・東神楽・旭川)
- 和木 美代子、安田 知子、福本 泰之、阿部 薫 (2017) ゼオライトを用いたアナモックスリアクターによる窒素除去の基礎的検討、2017.11.水処理生物学会第54回大会要旨集,57
- 阿部 薫,和木 美代子,駒田 充生(2016) 人工湿地の汚水流下方法と窒素浄化機能やANAMMOX・硝化菌の分布、日本土壌肥料学会 講演要旨集 題62集、163
- 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,張曉萌,泉本隼人,家次秀浩 (2016)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 2016.09.
- 阿部 薫,和木美代子,駒田充生 (2016) 人工湿地の窒素浄化へ機能炭利用可能性、日本水環境学会第11回人工湿地ワークショップ
- 阿部 薫,和木美代子,駒田充生 (2016) 表面流湿地と浸透流湿地の水質浄化機能とANAMMOX、第50回日本水環境学会年会講演集、425

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿部 薫 (ABE KAORU)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・物質循環研究領域・領域長
研究者番号：70355551

(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・上級研究員
研究者番号：10355092