

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289173

研究課題名(和文)実下水処理施設における亜酸化窒素の生成機構・排出動態の解明と対策手法の提示

研究課題名(英文) Dynamics, mechanisms and countermeasures of nitrous oxide emission at a full scale sewage treatment plant

研究代表者

藤原 拓 (FUJIWARA, TAKU)

高知大学・自然科学系・教授

研究者番号：10314981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：同一の流入下水を3種類の処理方式で処理する実下水処理施設を対象として、亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)の生成機構・排出動態の解明を目的とした調査を行った。3段階ステップ嫌気好気活性汚泥法では溶存(D-)N<sub>2</sub>O濃度が低かったのに対して、嫌気好気活性汚泥法の好気槽3において高濃度が観察され、溶存酸素(DO)濃度の急激な低下がN<sub>2</sub>Oの生成を引き起こすことが明らかになった。N<sub>2</sub>O生成・分解に関連する機能遺伝子を評価した結果、好気槽では還元反応によるN<sub>2</sub>Oの除去はほとんど見られず、N<sub>2</sub>O生成反応とそれを行う細菌群の追跡が重要であることが示された。以上より、N<sub>2</sub>Oの排出対策手法としては曝気量の制御が重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emission at a full scale wastewater treatment plant (WWTP) was investigated, in which the same influent sewage was treated by three different activated sludge systems in parallel, to clarify dynamics, mechanisms and countermeasures of the emission. Lower dissolved (D-) N<sub>2</sub>O concentrations were observed in an anoxic/oxic process with three-step feeding, while higher concentrations were detected at third oxic tank in an anoxic/oxic process. It was also found that sudden decrease of dissolved oxygen concentration induced N<sub>2</sub>O production in the tank. Evaluation of functional genes associated with N<sub>2</sub>O production and decomposition indicated that almost no N<sub>2</sub>O reduction occurred in the oxic tank and dynamics of N<sub>2</sub>O producing bacteria should be studied more in detail. In conclusion, aeration management is important to mitigate N<sub>2</sub>O emission from a full scale WWTP.

研究分野：用排水システム

キーワード：亜酸化窒素 実下水処理施設

1. 研究開始当初の背景

我が国における下水道施設からの温室効果ガス(GHG)排出量は、日本の総排出量の約0.5%を占めており、下水道施設からのGHGの排出削減が喫緊の課題となっている。その内訳としてエネルギー起源CO<sub>2</sub>が約52%、下水汚泥の焼却にともなうN<sub>2</sub>Oが約19%、水処理過程でのN<sub>2</sub>Oが約9%を占めることが報告されており、省エネルギーによるCO<sub>2</sub>排出削減および汚泥高温焼却によるN<sub>2</sub>O排出抑制等の対策が進められている。一方で、水処理過程でのN<sub>2</sub>O排出に関しては、処理方式や時刻、季節等による変動が大きく、その発生メカニズムが複数あることから、排出抑制対策が未確立な現状にある。水処理過程でのN<sub>2</sub>O排出の影響因子として、溶存酸素(DO)、亜硝酸、pH、COD/N比などが主にラボスケール実験に基づき指摘されている。しかしながら、ラボスケール実験では、回分・逐次回分処理方式での検討が大半であり、かつ流入負荷の日間・年間変動、微好気・微嫌気等の環境条件を十分に模擬できていないことから、実際の下水処理施設における排出抑制対策の確立には至っていない。また、ラボスケール実験では実施設の調査と比較してN<sub>2</sub>O排出係数が高い傾向を示し、過大評価の恐れがあることも報告されている。一方、実下水処理施設におけるN<sub>2</sub>O排出特性に関する調査事例は限られており、各々の影響因子の分離が困難かつ流入負荷変動が大きいことから、実施設の調査に基づくN<sub>2</sub>O発生メカニズムの解明は困難な現状にある。また処理方式によりN<sub>2</sub>O排出係数は大きく異なることから、すべての実下水処理施設に対して単一のN<sub>2</sub>O排出係数を適用することは不相当であり、複数の処理方式の実下水処理施設におけるN<sub>2</sub>O排出係数の比較評価は極めて重要である。実際の下水処理施設における排出抑制対策の確立を行なうには、N<sub>2</sub>Oの生成・消失速度の評価に加えて、そのメカニズムを実施設のデータに基づき解明するという課題が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、標準活性汚泥法をベースとした3種類の処理方式で同一の流入下水を処理する実下水処理施設を対象とし、N<sub>2</sub>O排出調査、水質・負荷量調査、ならびに分子生物学的調査を同時に実施することにより、実施設におけるN<sub>2</sub>Oの生成・分解メカニズムを考察するとともに、処理方式によるN<sub>2</sub>O排出量の比較を行うことを目的とする。また、N<sub>2</sub>O排出抑制のための対策手法を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 硝化にともなう亜酸化窒素生成反応のモデル化を目的としたラボスケール実験
- (2) 3種類の処理方式を対象としたN<sub>2</sub>O排出特性調査

- (3) N<sub>2</sub>O排出量の多い嫌気好気活性汚泥法を対象としたN<sub>2</sub>O変動特性調査

4. 研究成果

- (1) 硝化にともなう亜酸化窒素生成反応のモデル化を目的としたラボスケール実験

硝化反応時の亜酸化窒素生成特性を把握し、現象を数理モデル化することを目的として、4槽連結型リアクターを用いてラボスケール実験を行った。硝化リアクターからのN<sub>2</sub>Oの発生は、槽内の亜硝酸性窒素の蓄積との関連は低く、槽内でのアンモニア性窒素の消費と連動して生起することが示された。反応初期にはN<sub>2</sub>Oの発生速度が大きく、リアクターの継続運転でN<sub>2</sub>Oの発生割合は低下することが示された(図1)。また、急なアンモニア性窒素の負荷の上昇に対しては、N<sub>2</sub>Oの発生速度はアンモニア性窒素の消費速度と正の相関があり、総括として、アンモニア消費量の約1.8%がN<sub>2</sub>Oに変換された(図2)。アンモニア酸化細菌によるヒドロキシルアミン生成を経る代謝反応による生成が、硝化菌脱窒よりも、卓越していたものと考えられた。また第1槽におけるアンモニア性窒素濃度とN<sub>2</sub>O発生速度の関係は、緩やかにMonod式で表現でき、その際の半飽和定数は1.66mg/Lであった。アンモニア性窒素の濃度を安定化させることが、生物学的硝化反応において亜酸化窒素を抑制させる一つの手段になると考えられた。

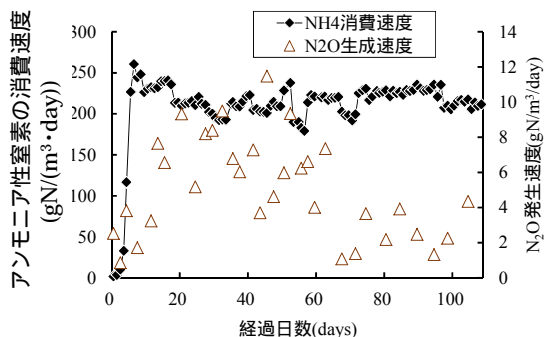


図1 連続式硝化リアクター第1槽におけるアンモニア性窒素の消費速度およびN<sub>2</sub>Oの発生速度

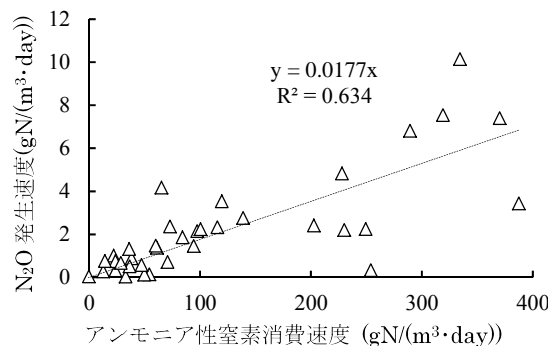


図2 濃度を変えた期間のアンモニア性窒素消費速度とN<sub>2</sub>O発生速度の相関

### (2) 3 種類の処理方式を対象とした N<sub>2</sub>O 排出特性調査

同一の流入下水を 3 種類の処理方式（2 ステップ嫌気好気活性汚泥法、嫌気好気活性汚泥法、凝集剤添加型 3 ステップ嫌気好気活性汚泥法）で並列処理している実下水処理施設を対象として、処理方式による N<sub>2</sub>O の生成機構・排出動態の比較・評価を行うことを目的とした定期調査を平成 26 年 1 月から月に 1 回の頻度で行った。各処理方式の流入水、最初沈殿池流出水、好気・嫌気反応槽、最終沈殿池流出水、返送汚泥を対象として有機物、窒素濃度を調査するとともに、各槽上部のガス態 (G-)N<sub>2</sub>O 濃度および各槽の溶存態 (D-)N<sub>2</sub>O 濃度を調査することにより、水質および N<sub>2</sub>O の時間・空間分布を評価した。有機物および窒素の処理性能はいずれの処理方式でも良好であったのに対して、D-N<sub>2</sub>O および G-N<sub>2</sub>O 濃度は処理方式により異なった。凝集剤添加型 3 段階ステップ嫌気好気活性汚泥法では D-N<sub>2</sub>O 濃度が比較的低かったのに対して、嫌気好気活性汚泥法の好気槽 3 において高い G-N<sub>2</sub>O および D-N<sub>2</sub>O 濃度が観察され、当該処理場における N<sub>2</sub>O の生成に対して嫌気好気活性汚泥法の寄与が大きいことが示唆された。一方、いずれの調査日、調査時間においても、最終沈殿池越流水中の D-N<sub>2</sub>O 濃度は安定して低く、この傾向は凝集剤添加型 3 ステップ嫌気好気活性汚泥法で顕著であり、その値は流入水より低いことが示された。

### (3) N<sub>2</sub>O 排出量の多い嫌気好気活性汚泥法を対象とした N<sub>2</sub>O 変動特性調査

嫌気好気活性汚泥法の好気槽 3 における D-N<sub>2</sub>O 濃度の変動特性を明らかにする目的で、N<sub>2</sub>O センサーを用いた連続モニタリングを行った。その結果、D-N<sub>2</sub>O 濃度は午後ピークが観察されたのに対して、深夜および早朝の濃度は非常に低く、大きな日間変動を有することが示された。同様の現象は繰り返し観察された。そこで、平成 27 年 11 月 25 日 11 時から 26 日 11 時にかけて、嫌気好気活性汚泥法を対象とした通日調査を行い、水質および亜酸化窒素濃度の日間変動を明らかにするとともに、亜酸化窒素濃度変動に対する影響因子を検討した。流入水および流出水の流量加重平均濃度は、BOD が 191mg/L および 2.5mg/L、全窒素が 34mg/L および 9.8mg/L であり、BOD 除去率が 98.7%、全窒素除去率が 71.1%と良好な処理が行われていた。また、処理水中の NH<sub>4</sub>-N は常に検出限界以下であり、完全硝化が生じていた。生物反応槽溶存 N<sub>2</sub>O 濃度に関しては、無酸素槽、好気槽 1 槽、好気槽 2 槽では常に検出限界以下であったのに対して、好気槽 3 では図 3 に示す変動が観察された。溶存酸素 (DO) 濃度低下直後の 25 日 12 時頃から溶存 N<sub>2</sub>O 濃度が上昇し、15 時 13 分にピーク 32.4μgN/L を観測した。オフガスによる好気槽 3 からの G-N<sub>2</sub>O 排出量の時間変動を図 4

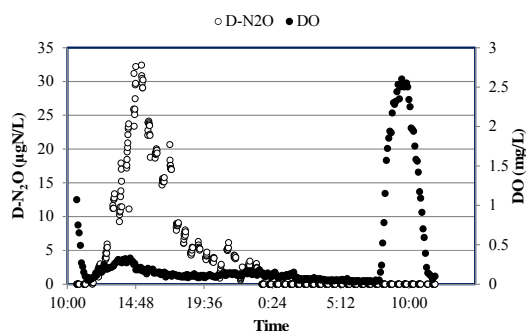


図 3 D-N<sub>2</sub>O および DO 濃度の時間変動 (好気槽 3)

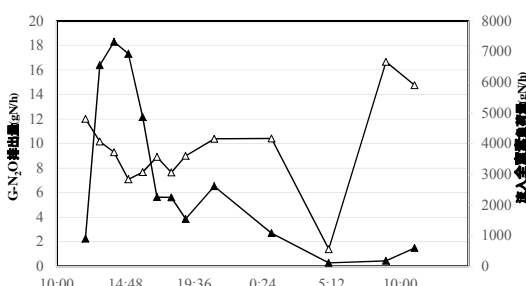


図 4 好気槽 3 からの G-N<sub>2</sub>O 排出量 (▲) と流入全窒素負荷量 (△) の時間変動

に印で示す。図 3 に示す D-N<sub>2</sub>O 濃度の時間変動と対応した変動が見られ、DO 濃度低下後の午後に排出量が急増し、14 時にピーク排出量 18.3gN/h を観測した後に低下し、夜間は概ね 5gN/h 以下で推移した。流入全窒素負荷量の時間変動を図 4 に印で併示したが、流入全窒素負荷量と D-N<sub>2</sub>O 濃度および G-N<sub>2</sub>O 排出量の関係は見られなかった。一方、DO 濃度に関しては、D-N<sub>2</sub>O 濃度および G-N<sub>2</sub>O 排出量との直線的な相関関係は見られなかったものの、図 3 および図 4 より DO 濃度の急激な低下が D-N<sub>2</sub>O の生成を引き起こすことが明らかになった。DO 濃度低下後の午後に D-N<sub>2</sub>O 濃度が急激に増加する現象は繰り返し観察された。

各活性汚泥槽から生成する N<sub>2</sub>O の生成・分解経路を考察するため、上記の通日調査の際に、N<sub>2</sub>O 生成・分解に関連する酵素反応をコードする機能遺伝子の転写活性を評価した。高須浄化センターの活性汚泥システムの各槽（嫌気槽・好気槽 1・好気槽 2 上流部・好気槽 2 下流部）から活性汚泥を採取し、DNA および RNA 抽出を行った。DNA は FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals 社) を用いて、RNA に関しては、RNA 抽出前のサンプル保存に RNA Later (Thermo Fisher 社) を用いて RNA 分解の遅延を行い、FastRNA Pro Soil Direct Kit (MP Biomedicals) にて抽出を行った。その後、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen 社) を用いて逆転写反応を行った。この相補的 DNA を用いて転写量を定量 PCR (CFX96 Touch, Bio-Rad 社) にて測定した。特に、アンモニア酸化細菌

や脱窒細菌の代謝反応による N<sub>2</sub>O 生成の可能性に着目し、アンモニア酸化酵素、ヒドロキシルアミン酸化還元酵素、亜硝酸還元酵素、一酸化窒素還元酵素、N<sub>2</sub>O 還元酵素をそれぞれコードする機能遺伝子 (*amoA*, *haoA*, *nirK*, *norB*, *nosZ* clade I, *nosZ* clade II) の日変動を定量 PCR 法により評価した。

機能遺伝子の DNA レベルでの定量の結果、各活性汚泥槽における機能遺伝子のコピー数は統計的に優位な差は無いことが分かった (図 5)。つまり、各活性汚泥槽における活性汚泥中の機能遺伝子の量はほぼ同じであり、各活性汚泥槽の環境がもたらす細菌群の活性により N<sub>2</sub>O の生成経路や生成量が決定されることが示された。

好気槽 2 の下流部の各機能遺伝子の DNA 量に対する mRNA の転写量の比を、相対転写量として図 6 に示す。窒素負荷の増大により溶存酸素濃度が低下し、その結果として溶存 N<sub>2</sub>O 濃度の急激な上昇が見られた時間帯では、*amoA* および *haoA* の DNA に対する mRNA の相対転写量が高い傾向を示した。したがって、窒素負荷増大により、アンモニア酸化をコードする遺伝子 (*amoA*) やヒドロキシルアミン酸化をコードする遺伝子 (*haoA*) の転写量が増大し、その結果 N<sub>2</sub>O の生成が促進された可能性が示された。一方、溶存酸素濃度の低下によっても *nirK* mRNA、*norB* mRNA の DNA に対する相対転写量に大きな変化は見られなかった。また、溶存 N<sub>2</sub>O が高濃度に検出された時間帯においては、従属栄養細菌の N<sub>2</sub>O 還元酵素をコードする *nosZ* clade I、*nosZ* clade II mRNA の DNA に対する相対転写量は大きな変化がなかった。好気槽において還元反応による N<sub>2</sub>O の除去はほとんど見られず、酸素を供給して

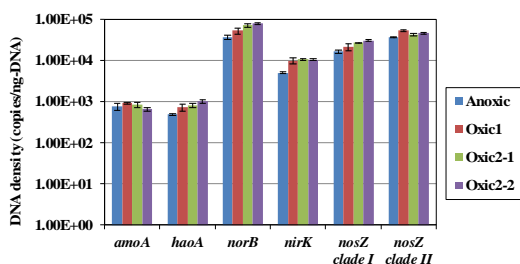


図 5 各機能遺伝子の定量 PCR による定量結果

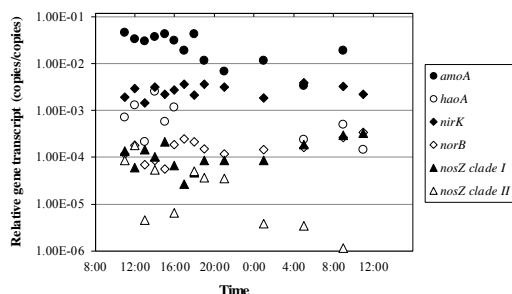


図 6 各機能遺伝子の相対 mRNA 転写量

いる活性汚泥槽においては、N<sub>2</sub>O 生成反応とそれを行う細菌群の追跡が重要であることが示された。

以上を踏まえて、N<sub>2</sub>O の排出対策手法としては、曝気量の制御が重要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 西村文武, 村角浩平, 楠田育成, 高部祐剛, 水野忠雄 (2015) 亜硝酸型硝化 - ANAMMOX プロセスにおける亜酸化窒素の排出特性に関する基礎的研究, 土木学会論文集 G (環境) 70 巻, III\_243-III\_249 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 藤原拓, 陳小強, 賈思静, 西村文武, 寺田昭彦, 筒井裕文, 石川 進, 嫌気好気活性汚泥法実施における亜酸化窒素濃度の時間変動と影響因子の検討, 第 50 回水環境学会年会, アスティとくしま, 2016 年 3 月 16-18 日.
2. Sijing JIA, Xiaoqiang CHEN, Hirofumi TSUTSUI, Taku FUJIWARA, Susumu ISHIKAWA, Fumitake NISHIMURA, Shaolan DING, Nitrous oxide variations in a full-scale anoxic/oxic wastewater treatment system, Water and Environment Technology Conference 2015 (WET2015), Tokyo, Japan, 2015 年 8 月 5 日 ~ 6 日.
3. Fumitake NISHIMURA: Characteristics of nitrogen removal and nitrous oxide emission through partial nitrification-anammox process, International Conference on Biofiltration and Bioconversion (Biofiltration-2015), 中国・長沙, 湖南大学, 2015 年 7 月 9 日 ~ 11 日.
4. 西村文武, 村角浩平, 水野忠雄, 高部祐剛, 生物学的硝化反応時における亜酸化窒素生成に及ぼすアンモニア濃度変化の影響, 日本水環境学会年会, 金沢大学, 2015 年 3 月 16 日 ~ 18 日.
5. Q. Zhang, X. Chen, H. Tsutsui, T. Fujiwara, F. Nishimura, S. Ishikawa, S. Ding, Temporal and spatial variations of nitrous oxide in a full-scale anoxic/oxic process with three-step feeding, 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries, ザ クラウンパレス新 阪急高知, 2014 年 11 月 24 日 ~ 11 月 26 日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤原 拓 (FUJIWARA TAKU)

高知大学教育研究部自然科学系・教授

研究者番号：10314981

### (2)研究分担者

筒井裕文 (TSUTSUI HIROFUMI)

東京工科大学応用生物学部・助教

研究者番号：70620649

西村文武 (NISHIMURA FUMITAKE)

京都大学大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60283636

寺田昭彦 (TERADA AKIHIKO)

東京農工大学大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30434327

### (3)連携研究者

なし