

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340059

研究課題名(和文) 開発途上国での使用を目指した複合的脱窒処理による省資源型窒素除去システムの開発

研究課題名(英文) Development of ecofriendly nitrogen removal system by hybrid bacterial denitrification activity for the usage in developing countries

研究代表者

風間 ふたば (KAZAMA, Futaba)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：00115320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：地下水の硝酸汚染は、特にそれを飲料水に用いている開発途上国において問題である。水素酸化脱窒反応を主とする、より処理コストの低い装置開発を目指し、まずは使用する水素ガス供給量の削減の可能性を、反応槽内の微生物種と窒素除去能から検討した。マイクロバブルの使用や水素ガスの間欠供給により、高い窒素除去能を示しつつも水素ガスの削減は可能であること、さらに、その時にHydrogenophaga spp.とともに必ず Thauera spp.が優先することを明らかとした。水素酸化脱窒においても複合的微生物作用により高窒素除去能が得られたことを示唆しており、今後の処理装置の開発に有用な情報を得た。

研究成果の概要(英文)：Especially in developing countries, nitrate contamination of groundwater has become a serious issue affecting the quality of drinking water and health. For development of ecofriendly simple reactor to remove nitrate via hydrogenotrophic denitrification (HD), an intermittent hydrogen supply or a usage of hydrogen microbubble were tried to improve the hydrogen effectiveness and the reduction of treatment cost. Using a cycle with a short period of hydrogen supply or a hydrogen microbubble supply, the excellent nitrogen removal efficiency (96%) was achieved. Furthermore, Hydrogenophaga spp., which is well known as HD bacteria, was dominant under the continuous hydrogen supply system, whereas Thauera spp. were the most abundant species in the effective reactor with reduction of hydrogen supply amount. These results support strongly the existence of the hybrid bacterial denitrification activity in HD reactor and might be important information to develop a new HD treatment system.

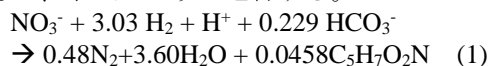
研究分野：環境学

キーワード：窒素除去 水処理 水素酸化脱窒 複合微生物脱窒処理 マイクロバブル

### 1. 研究開始当初の背景

世界的に地下水中の硝酸イオン濃度が高い地域は多い。特に開発途上国の農村部などでは、食糧増産のために化学肥料の使用量が増加すれば、それに伴って今後も汚染地下水量が増加することが予想されているが、このような地域では飲料水を地下水に頼っている所も多い。その場合、WHOの基準値である硝酸性窒素・亜硝酸性窒素の合計として10mg-N/L以下を上回る濃度で地下水に窒素成分が存在しているなら、地下水処理を導入する必要がある。この処理の導入において、先進国と異なり資源やエネルギーが豊かとはいえない開発途上国では、エネルギー消費が少ない方法が望まれ、さらに維持管理が容易な方法でなければ地域住民が使うことは難しい。

水素酸化脱窒は独立栄養細菌による脱窒反応で、下式のように進行する。



排水から窒素成分を除去する生物学的な脱窒方法としては、従属栄養細菌を用いる方法が一般的で、嫌気的条件下で有機物添加が必要である。しかし水素酸化脱窒では、式(1)に示したように無機炭素があれば有機物添加が不要である。また系に添加するのは水に溶けにくい水素だけで、これは処理後に水中から大気中に揮散して処理残留物がないことから、水素酸化脱窒細菌を用いる方法は浄水処理に適すると考えられている。

水素酸化脱窒細菌は比較的広く自然界に分布しており、例えば浄水場の沈殿池汚泥を種としたリアクターに硝酸性窒素を添加し、水素ガスを注入するだけで容易に増殖する。処理対象水に水素ガスを注入するだけなので、この方法は処理としては非常に簡便である。しかしこの処理法のネックは水素ガスが水に溶けにくいこと（飽和溶存水素濃度は、1気圧では1.6mg/L）と、コストが高いことにある。式(1)に示したように、理論上は除去したい硝酸性窒素濃度の約3倍モルの水素があれば反応は進行することになるが、実際に開放系のリアクターに、通常の散気方法で水素ガスを注入すると、リアクターの形状にもよるが、後述するように少ない場合でも添加水素ガス量の90%以上、多ければ99%は大気に移行してしまう。

ところで、水素酸化脱窒リアクター内の微生物集団についての知見は多くはない。それは、上記のような水素ガスの特性ゆえに、水処理分野の研究者の多くが、リアクターには理論上必要とされる水素量よりはるかに多くの水素を添加して、水素酸化脱窒細菌を優先させることがこの研究のスタートとしたからである。しかし、微生物による水処理装置のすべてがそうであるように、メインプレイヤーとしての微生物の存在は必要でも、そのリアクターが安定的に長期間機能できるのは、内部での微生物集団の機能による。水

素酸化脱窒処理に関しては、このような観点から研究された報告は少なかった。本研究のように水素ガス供給量を少ない条件下で運転した場合、リアクターとしての機能の変化と微生物群集の変化とを理解しておくことは、より安定したリアクターの設計においても重要な情報だと考えたのが本研究の背景である。

### 2. 研究の目的

本研究では、最終的には開発途上国での使用を想定した水素酸化脱窒装置を開発することだが、ここでは、運転コスト削減のため、①どこまで水素ガス供給量の削減が可能であるか、②またその時リアクター内に出現する複合的脱窒プロセスの機構はどのようなものであるかを明らかにしようとした。

### 3. 研究の方法

実験においては、まず水素ガスを十分量供給した条件で水素酸化脱窒リアクターを立ち上げ、その反応槽の運転条件（水素添加量や滞留時間など）を意図的に大きく変化させることで生じるレスポンスを、水質分析とガス分析ならびに、微生物群集解析により検討した。また、水素添加量を削減しつつも添加した水素をより効率的に微生物反応に利用できる方法として、水素ガスの供給方法を連続注入法から間欠注入法に変えて窒素除去性をみた。さらに、通常はエアストーンによる水素供給（バブルはミリサイズが主）を行っていたが、マイクロバブル発生器を通してバブルサイズを小さくした場合についても、検討を行った。

具体的な実験はリアクターを立ち上げてその窒素除去性能を経時的に評価すること、反応槽内の微生物群集構造解析を行うことで、代表的な実験方法を図1に示す。これは、容量約2Lの円筒形リアクターで、底部に水素散気口を置き、処理水は底部から上昇流でリアクター内を通過する。装置内は $32 \pm 2^\circ\text{C}$ となるようコントロールし、これに、

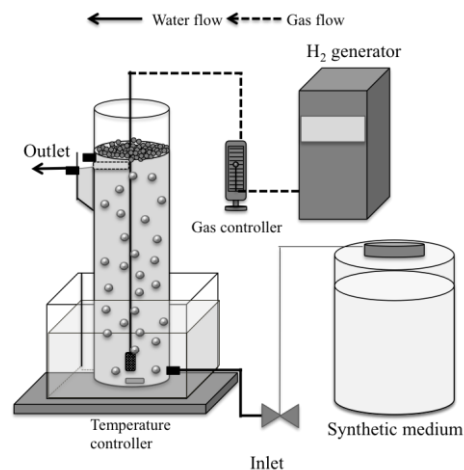


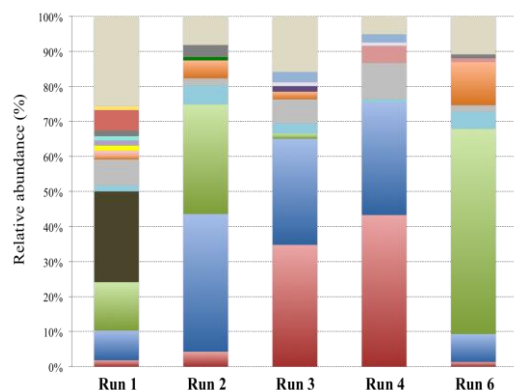
図1 実験に用いた基本的な反応槽

汚染が強い地下水を想定して硝酸性窒素濃度 40mg/L の水を模擬地下水として流入させた。

#### 4. 研究成果

上述のような実験方法により、いくつかの反応槽を立ち上げ、研究成果を報告してきたが、ここでは本研究成果を要約する実験結果を示す。

図2は、図1に示したリアクターを複数用意して同時に実験を開始し、1週間から3週間ほど運転した後の結果である。連続供給法においては水素ガス供給量を変化させた。



Run	1	2	3	4	6
水素ガス供給量 ml/min	1	2.5	5	10	5
注入方法	連続	連続	連続	連続	間欠
窒素除去率 (%)	10-20	80-85	95-100	95-100	95-100

図2 水素酸化脱窒リアクターの運転状況と窒素除去率ならびに菌叢解析結果

また水素ガス供給方法として連続供給法と、間欠供給法 (3分ON・5分OFF) を比較した。ここから以下が指摘できる。

- 5 mL/min 以上の水素注入量 (Run 3-Run 6) であれば連続、間欠注入法のいずれにおいても窒素除去率は 95%以上を達成する。
- 連続注入法で高い窒素除去率 (95%以上) を示したリアクターには *β-Proteobacteria* 綱に属する 2 種の細菌 (*Rhodocyclaceae* 科の未同定細菌種 (図中ピンク色) と水素酸化脱窒細菌として有名な *Comamonadoceae* 科の *Hydrogenophaga* 属 (図中青色)) が優占化する。
- 間欠注入法では *Rhodocyclaceae* 科の *Thauera* 属 (図中黄緑色) が優占化する。
- 連続注入法と間欠注入法では脱窒反応のメインプレイヤーが異なる可能性が高い。

一方、供給する水素ガスのバブルサイズがどのように窒素除去量に影響するかをみるために、マイクロバブルを用いた検討も行った。図1と類似のリアクターで水素ガス供給量 1ml/min としたときでも、マイクロバブル

を用いると窒素除去率は 95%以上となった。この時供給した水素ガス量に対して大気放出された水素ガス量は、エアストーンでは 90%以上であるのに対してマイクロバブルでは約 50%にまで低下させることができ (図3)、水素ガス削減効果が大きいことが分かった。

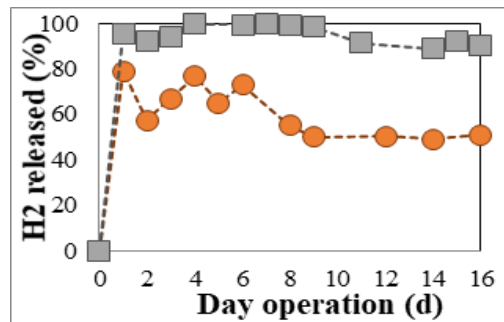


図3 供給水素ガスの大気放出率の比較

(□ : エアストーン ○ : マイクロバブル  
ともに水素ガス供給量は 1mL/min)

た。また、この時の菌叢解析の結果、優占種は、先の図2の Run6 と同じく *Rhodocyclaceae* 科の *Thauera* 属であることも明らかとなった。

以上のように、水素酸化脱窒リアクターの運転において水素ガスの供給量を削減しても窒素除去能は必ずしも低下しないこと、またリアクター内には確かに複数の優占種が存在していること、水素供給量を削減しつつも高い窒素除去能を示したリアクターにおいては、水素酸化脱窒細菌として有名な *Comamonadoceae* 科の *Hydrogenophaga* 属の存在は確かなものの、必ずしもそれが優占種とはならず、むしろ必ず *Rhodocyclaceae* 科の *Thauera* 属の存在が大きいことが、明らかとなった。

これまで水素酸化脱窒反応において、窒素除去率と微生物相との関係を示した研究はなく、さらに水素ガス添加量削減を狙った研究はなかった。その点から、本研究で得られた成果は、より低コストの水素酸化脱窒処理装置の作成に向けて、新たな情報を提供することになる。研究に着手した当初は、共存微生物としては一般的な従属栄養細菌が出現するのではないかと考えていた。有機物としてリアクター内の微生物残差を使い、分解して生成された二酸化炭素を独立栄養細菌である水素酸化脱窒が使うといった炭素循環が生じることが水素ガスの削減につながるのではないかと予想していた。しかし菌叢解析結果から、優先して出現した微生物は、窒素除去については情報が少ない *Thauera* 属であった。リアクター内に出現した *Thauera* 属が脱窒においてどのような機能を有しているかについては、本研究期間内で明らかにすることはできなかったが、水素酸化脱窒処理を効率的に進めるにあたり、極めて重要な新しい研究テーマが見いだされた。

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 4 件)

- ① R. Eamrat, Y. Tsutsumi, T. Kamei, W. Khanichaidecha, F. Kazama, Optimization of hydrogenotrophic denitrification behavior using continuous and intermittent hydrogen gas supply., Journal of Water and Environment Technology, 査読有, 15 巻, 2017, pp. 65-75
- ② R. Eamurat, T. Mochizuki, T. Kamei, F. Kazama, Hydrogenotrophic denitrification activity under intermittent hydrogen supply., Naresuan University Engineering Journal, 査読有, 11 巻, 2016, pp. 47-51
- ③ T. Kamei, S. Shimizu, Y. Tanaka, F. Kazama, Anaerobic ammonium oxidation bacteria communities in long-term cultivated sludge: A comparison between mesophilic and psychrophilic condition., 日本水処理生物学会誌, 査読有, 52 巻, 2016, pp. 1-9
- ④ T. Kamei, D. Naitoh, W. Khanichaidecha, F. Kazama, Simultaneous removal of ammonium and nitrate by a combination of ANAMMOX and hydrogenotrophic denitrification., Journal of Water and Environmental Technology, 査読有, 13 巻, 2015, pp. 167-178

[学会発表] (計 13 件)

- ① 堤裕也、R. Eamirat、亀井樹、風間ふたば、田中靖浩、水素酸化脱窒リアクター内の微生物群集解析、第 51 回日本水環境学会、2017 年 3 月 17 日、熊本県熊本市
- ② K. Shinoda, T. Kamei, F. Kazama, Demonstration of nitrogen removal by combination system of hydrogenotrophic denitrification and ANAMMOX., 4<sup>th</sup> International Young Researchers Workshop on River Basin Environment and Management, 2016 年 11 月、Ho Chi Minh City (Vietnam)
- ③ R. Eamirat, Y. Tsutsumi, T. Kamei, W. Khanichaidecha, F. Kazama, Ultrafine bubble diffuser for enhancing hydrogen-dependent denitrification of groundwater., 13<sup>th</sup> IWA Specialized Conference on Small Water and Wastewater System, 2016 年 9 月 16 日、Atens (Greece)
- ④ 亀井樹、風間ふたば、田中靖浩、ANAMMOX 反応の浄水処理への適用-理論の構築とその実証-、第 19 回日本水環境学会シン

ポジウム(招待講演)、2016 年 9 月 13 日、秋田県秋田市

- ⑤ T. Kamei, M. Nakano, S. Pathak, F. Kazama, On site ANAMMOX bacteria cultivation for groundwater treatment. A case study in Kathmandu, Nepal., Water and Environment Technology Conference, 2016 年 8 月 28 日、東京都文京区
- ⑥ Y. Tsutsumi, T. Kamei, F. Kazama, Usefulness of microbubble application to hydrogenotrophic denitrification reactor., Water and Environment Technology Conference, 2016 年 8 月 28 日、東京都文京区
- ⑦ R. Eamirat, Y. Tsutsumi, T. Kamei, W. Khanichaidecha, F. Kazama, Optimization of hydrogenotrophic denitrification behavior with hydrogen gas supply., Water and Environment Technology Conference, 2016 年 8 月 28 日、東京都文京区
- ⑧ K. Shinoda, T. Kamei, F. Kazama, Effect of pH on hydrogenotrophic denitrification process., Water and Environment Technology Conference, 2016 年 8 月 28 日、東京都文京区
- ⑨ 望月智耶、堤裕也、亀井樹、風間ふたば、間欠式水素供給方法を用いた独立栄養性水素酸化脱窒リアクターの開発、第 50 回日本水環境学会年会、2016 年 3 月 16 日、徳島県徳島市
- ⑩ 堤裕也、望月智耶、亀井樹、風間ふたば、水素酸化脱窒リアクターへのマイクロバブル利用の有効性に関する基礎検討、第 50 回日本水環境学会年会、2016 年 3 月 16 日、徳島県徳島市
- ⑪ R. Eamrat, T. Mochizuki, T. Kamei, F. Kazama, Hydrogenotrophic denitrification activity under hydrogen supply using micro-bubble system., 3<sup>rd</sup> International Young Researchers Workshop on River Basin Environment and Management, 2015 年 12 月、Phitsanulok (Thailand)
- ⑫ T. Mochizuki, T. Kamei, R. Eamurat, F. Kazama, Effect of diffuser types on activity of hydrogenotrophic denitrification., Water and Environment Technology Conference, 2015 年 8 月 6 日、東京都千代田区
- ⑬ 望月智耶、亀井樹、風間ふたば、マイクロバブルを用いる脱窒リアクターの開発、第 49 回日本水環境学会年会、2015 年 3 月 17 日、石川県金沢市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

風間 ふたば (KAZAMA, Futaba)  
山梨大学・総合研究部・教授  
研究者番号：00115320