

B-16 地球温暖化抑制のためのCH₄、N₂Oの対策技術開発と評価にする研究

(9) 東北アジア地域におけるCH₄、N₂O抑制のための汚水・汚泥の適正処理技術の開発

① 中国におけるCH₄、N₂O抑制のための汚水・汚泥の適正処理技術の開発

研究代表者 国立環境研究所地域環境研究グループ開発途上国環境
改善（水質）研究チーム 稲森悠平

環境庁国立環境研究所

地域環境研究グループ開発途上国環境改善（水質）研究チーム 稲森悠平・水落元之
呉 暁磊 (EF フェロー)

平成7-9年度会計予算額	9,810千円
(9年度予算額)	3,271千円)

「要旨」 典型的な従属栄養細菌である*Alcaligenes faecalis*を活性汚泥の中に添加した排水処理システムを用いて、*Alcaligenes faecalis*の接種量およびCOD対全窒素の比を変化させて、嫌気条件下実験検討を行った。その結果、*Alcaligenes faecalis*の接種した系では、活性汚泥のみの系と比較してN₂Oの発生量はおよそ50%に低下した。さらに、*Alcaligenes faecalis*接種系は窒素の除去能が高く、活性汚泥のみの系より約30%高い全窒素の除去率が得られた。CODの除去について、前者の系もより高いCOD除去能が見られた。そのために、*Alcaligenes faecalis*を活性汚泥排水システムの中に添加し優占されるのは、N₂Oの発生抑制および排水処理能を向上することができることと考えられる。*Alcaligenes faecalis*の添加量を多くすることにより、高いCOD対全窒素の比を保持した実験条件では、N₂Oの発生量を低く抑えられ、高いCODおよび窒素除去能が得られることがわかった。

キーワード：*Alcaligenes faecalis*、嫌気条件、N₂O発生抑制、窒素除去、優占種

1. 序

中国は世界で最大の発展途上国であり、環境汚染は極めて深刻である。その環境悪化を改善するためには国際協力と応用できる技術力が望まれており、これを実現することにより地球環境の保全のために大きな役割が達成できることとなる。中国の経済および技術背景を考えると、中国に適用できる高度技術は、高い排水処理の効果と低コストの技術力ではなければならない¹⁾。微生物は排水処理の制御に重要な役割を演じているが、N₂O生産にも関与している²⁾。典型的な微生物の挙動を明らかにすることによって、また、強力な排水処理能力と低濃度のN₂O発生機能を有する有用な微生物の導入およびこのような微生物を優占化させること、更にこれら微生物の能力を制御し機能を強化するために排水処理システムを改善することにより、新しい排水処理技術を発展させることが可能となる。本研究は、特定微生物の機能を明らかにすることから開始され引き続いて、更に規模を拡大した排水処理システムにおけるこれらの微生物の機能と挙動の実態解明に関する研究に発展されつつある。

本研究の初年度（H7年度）において、排水処理システムに一般的に存在する三種の典型的な微生物として代表的な独立栄養の硝化細菌*Nitrosomonas europaea*と*Nitrobacter winogradskyi*と典型的な従属栄養である硝化・脱窒細菌の*Alcaligenes faecalis*^{3) 4)}のN₂O生成の機構および窒素除去能を純培養実験で検討した⁵⁾。その中で、*A. faecalis*がN₂O生成抑制および窒素除去に重要な役割を果たしていると同時に更にN₂O発生と環境因子との間に密接な関係のあることを明らかにした^{6) 7)}。*A. faecalis*のような細菌が従属栄養性であり、大量培養し易く、更に硝化・脱窒が両方できるので、排水処理生態系中に大量接種されて優占化し易いので実際の排水処理プロセスの中にも重要な役割とする可能性があると考えられた。

そして、次年度のH8年度において、*A. faecalis*を活性汚泥中に導入し、*A. faecalis*のマイクロゾムとして活性汚泥中における挙動およびN₂O発生の減少と窒素除去能の向上に果たす役割、好気条件下における検討より*A. faecalis*が活性汚泥のシステムにおいてN₂O発生抑制に重要な役割を果たす可能性のあることを明らかにした⁸⁾。

一方、嫌気の活性汚泥プロセスが脱窒などのため世界中広く応用されていて、脱窒などのため非常に重要不可欠である⁹⁾。従って、今年（H9年度）において、*A. faecalis*が活性汚泥中に導入され嫌気条件下における*A. faecalis*のN₂O発生と窒素除去の挙動を研究した。

2. 研究目的

従属栄養性生活ためN₂O生成抑制に重要な役割をはたしている*A. faecalis*についてスケールアップした実験系を組み、N₂O発生の制御手法の開発研究を行うこととした。すなわち、*A. faecalis*のような典型的な従属栄養硝化・脱窒細菌は、*N. europaea*のような独立栄養細菌より大量培養が極めて容易であり、N₂O放出抑制および窒素除去率の増大に重要な役割を果たすことから*A. faecalis*の活性汚泥中に導入した場合のN₂O発生の減少および窒素除去能の向上を図ることを目的として活性汚泥処理プロセスを用いた高度化システムの開発を行った。

3. 研究方法

A. faecalis(IFO14479)を、文献6)に報告されたような培地および培養方法により大量培養し遠心分離によって高濃度の*A. faecalis*が得られた。この*A. faecalis*をつくば市M排水処理施設の沈殿池から取った生活性汚泥を馴化した活性汚泥生態系で優占化させるために容積2.75Lの活性汚泥反応槽（図1）に添加して培養した。二つの実験系、すなわち反応槽内におけるCOD対全窒素（以下、COD:TN）の比（2.35:1、3.81:1、4.26:1）の影響（以下、この実験がCN Experimentsと呼ばれる）および*A. faecalis*の量（10⁹、10¹⁰、10¹¹ CFU・l⁻¹）の影響（以下、この実験はAmount Experimentsと称す）について検討した。実験条件が表1に示す。これらのすべての実験系で基質として人工排水を用いた。また対照系として活性汚泥のみの系（表1に示すように*A. faecalis*の接種量が0とする）を用いた。そして、表1に示すようにCN Experimentsには*A. faecalis*と活性汚泥を両方含む装置（以下AF反応装置）三つと活性汚泥のみを含む装置（以下AS反応装置）三つを用い、Amount ExperimentsにAF反応装置三つとAS反応装置一つを用いた。*A. faecalis*接種した後運転一ヶ月間実験系の操作

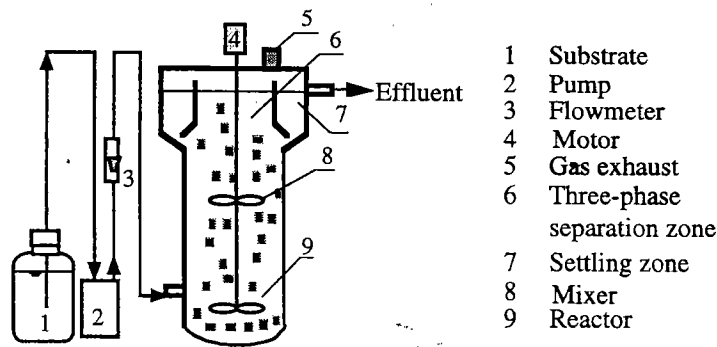


Figure 1 Schematic diagram of experimental set-up

が安定になったと思われるから流入および処理水のNO₃-N、NO₂-N、NH₄-N、全窒素、

Table 1 Operation parameters

Experiment	Amount Experiments				CN Experiments					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reactor No										
C:N ratio		3.8:1			4.26:1		3.8:1		2.35:1	
Amount of <i>A. faecalis</i> (10 ¹⁰ CFU ⁻¹)	0	0.1	1	10	0	1	0	1	0	1
SRT (for sludge) (day)					14					
HRT (hr)					8					
Temperature (°C)					20					

CODおよび放出されたN₂Oの濃度の分析を文献8) と10~12) に報告されたような分析方法で行った。

4. 結果および考察

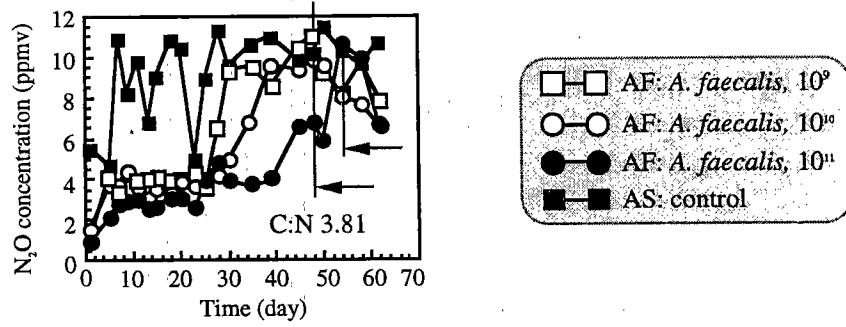
4.1 N₂O発生時の*A. faecalis*添加系および活性汚泥系における特徴

コントロールとしてAS反応装置と*A. faecalis*を活性汚泥に添加したAF反応装置から放出されたN₂O濃度の変化および分析を始めた後の前30日のN₂O平均濃度と*A. faecalis*添加量、また、そのN₂O平均濃度とCOD:TNの比の間の関係が図2と図3に示す。

*A. faecalis*の接種量の影響の実験 (Amount Experiments)では*A. faecalis*の量を10¹⁰CFU⁻¹含む反応槽は10¹⁰CFU⁻¹および10¹¹CFU⁻¹を含むAF反応装置よりもN₂Oの発生量が高かった。平均N₂O放出量が最低の*A. faecalis*の量を10¹¹CFU⁻¹含む反応槽の平均N₂O発生量が1とすれば、*A. faecalis*の量を10¹⁰CFU⁻¹および10¹⁰CFU⁻¹含む反応槽の平均N₂O発生量が1.43と1.19になった。一方、コントロール系のN₂O発生、つまり、AS反応装置ではAF反応装置の放出量よりもその量は高くなった。AS反応装置の平均放出量は*A. faecalis*を10¹⁰CFU⁻¹含む反応槽の最大の平均N₂O放出量よりも1.88倍高くなることがわかった。

COD:TNの比の影響の試験 (CN Experiments)の結果、AS反応装置とAF反応装置を比較すると、*A. faecalis*を添加したAF反応装置からAS反応装置の放出量により少ないN₂Oが放出された。COD:TNの比が4.26:1、3.81:1と2.35:1の場合には、AS反応装置の平均

(A) Amount Experiments



(B) CN Experiments

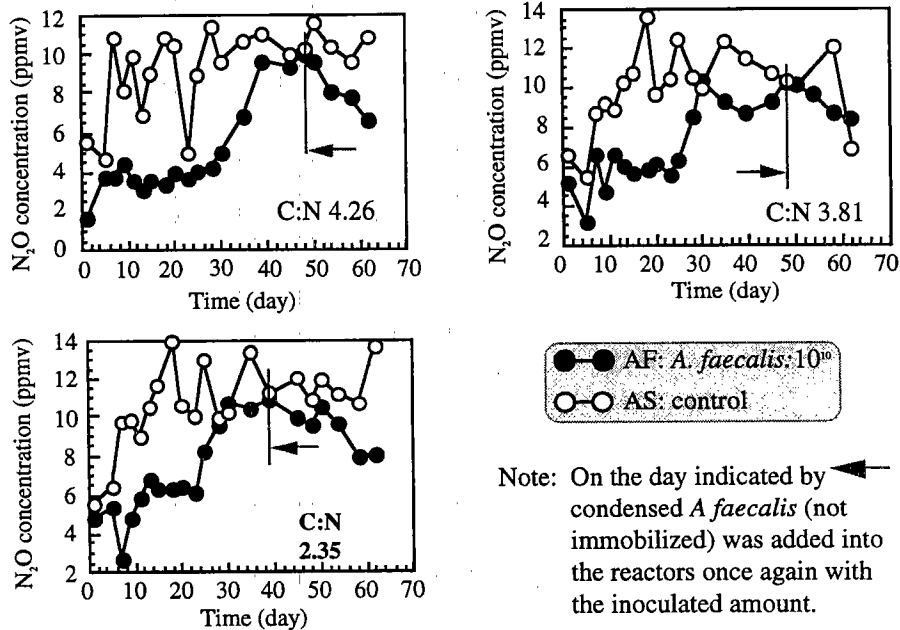


Figure 2 Variation of N_2O concentrations in gas phase versus time

N_2O 放出量が1とすれば、AF反応装置からの平均 N_2O 放出量が0.62、0.64と0.43になった。三つのCOD:TNの比の間と比較して、平均 N_2O 放出量はCOD:TNの比が低くなると、AF反応装置はおよそAS反応装置の両方には高くなった。この結果によって、COD:TNの比が低い場合には、活性汚泥システムの N_2O が出やすいことで、活性汚泥システムを基準として *A. faecalis*はより大きな N_2O 発生抑制の役割を果たす可能となることと推察された。更に、これらのことから、嫌気条件下における N_2O 発生抑制のためCOD:TNの比を適切にする必要のあることがわかった。

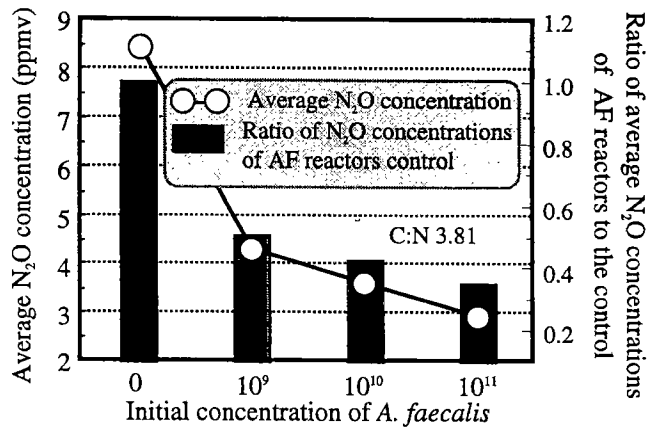
とりわけ活性汚泥への *A. faecalis*の導入は、 N_2O 発生を削減するために重要であることが分かった。二つの実験系の結果に基づき N_2O 発生量を比較するとCOD:TNの比が、 N_2O の発生量に対して著しく *A. faecalis*に影響を及ぼすものと考えられた。

4.2 *A. faecalis*導入したプロセスの窒素除去特性

AS反応装置とAF反応装置の全窒素除去率の変化およびその分析が始まった前30日の平

均全窒素除去率と*A. faecalis*添加量また、とCOD:TNの関係について図4と図5に示す。

(A) Amount Experiments



(B) CN Experiments

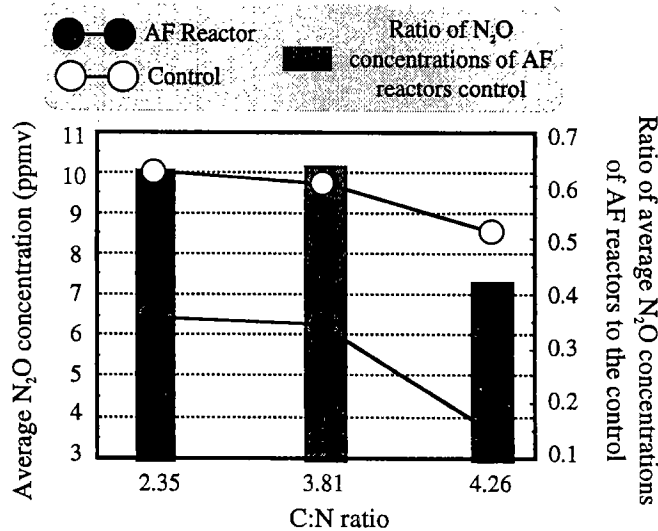
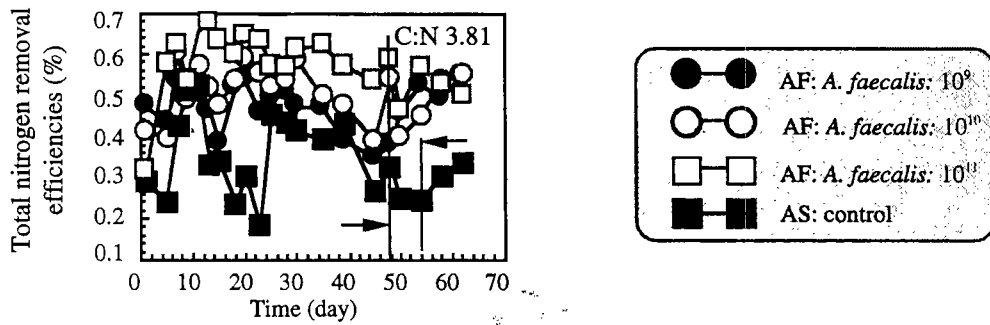


Figure 3 Average N_2O concentration of the first 30 days

COD:TN比のいかんによらず平均の全窒素除去効果は、そのAS反応装置におけるCOD:TN比が2.35:1から4.26:1へ増えるにつれて平均の全窒素除去効果はAF反応装置に30.9%から54.1%に増加し、同時的にAS反応装置にも28.8%から43.9%に増加した。AF反応装置とAS反応装置の平均全窒素除去率に比べると、COD:TNの比の2.35:1、3.81:1と4.26:1の三つの場合にはAF反応装置の平均全窒素除去率はAS反応装置の平均全窒素除去率の1.07、1.46と1.23倍になった。このことは*A. faecalis*の導入によって全窒素除去能力がほぼ7%~46%高まったことを意味する。そのうえで、COD:TNの比の三つの値中で3.81:1の場合には、一番大きいAF反応装置とAS反応装置の平均全窒素除去率の差が見られた。この結果から、全窒素の除去に対し*A. faecalis*の適当な添加量が存在することと考えられた。この理由として、*A. faecalis*の添加には大量培養のためにコストが高くなることで

(A) Amount Experiments



(B) Amount Experiments

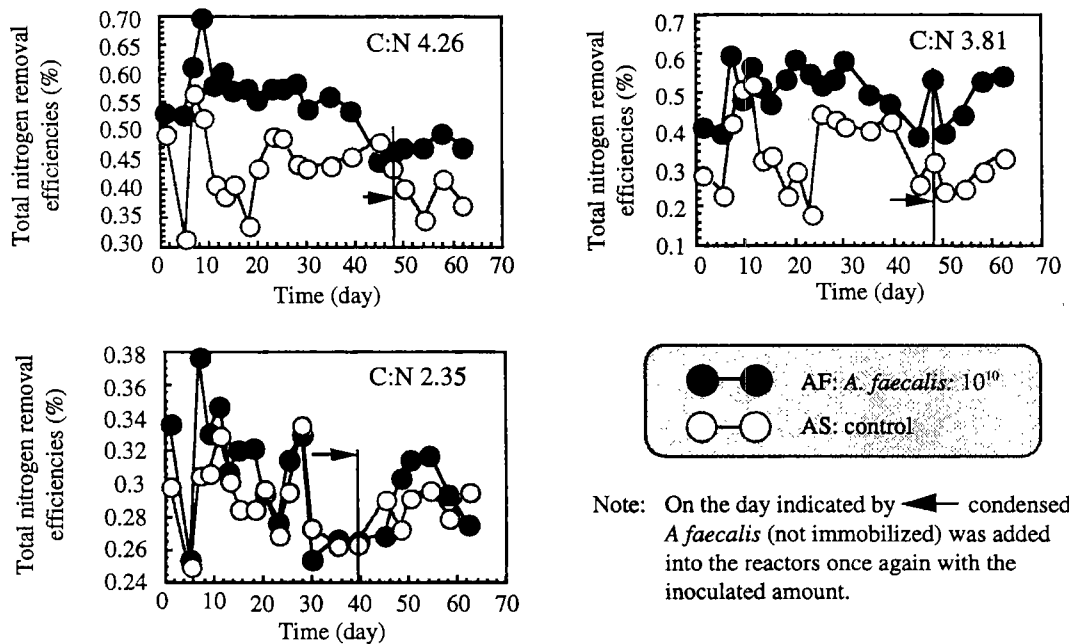


Figure 4 Variation of total nitrogen removal efficiency versus time

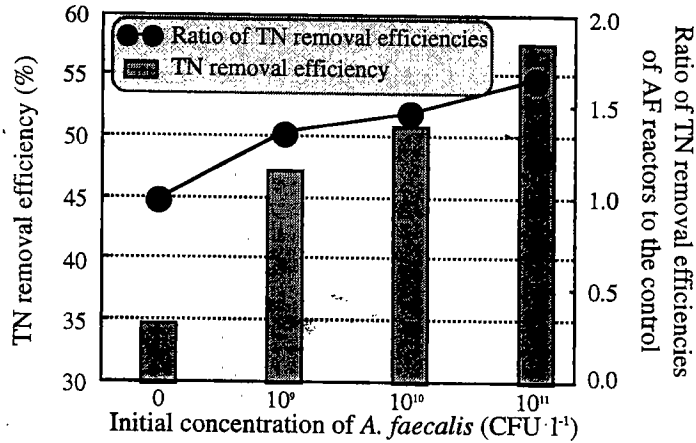
ある。

Amount Experimentsの結果、*A. faecalis*の添加量が少ないとAF反応装置では全窒素の除去率も低下した。しかしながら、全窒素の除去率はすべてのAF系においてAS系よりも高く1.01-1.65倍の除去率となった。嫌気条件下における窒素の除去は主に生物脱窒反応および微生物的な同化によるものと考えられる。AF反応装置とAS反応装置の中生物量ほぼ同じとしたので、AF反応装置における比較的高い全窒素除去効果は、微生物的な同化だけではなく*A. faecalis*が従来脱窒細菌として知られておりその脱窒能が進んだことであることが理由と考えられた。

4.3 *A. faecalis*導入したプロセスの有機物除去特性

COD除去率は図6に示すとおりであるが、AF反応装置では68.3%~91%であり、AS反応装置のCOD除去率によりおよそ5%~19%高くなった。全窒素の除去効果向上は著しく高まったが、*A. faecalis*はCOD除去能の向上には窒素に比べると低いものと考えられる。

(A) CN Experiments



(B) CN Experiments

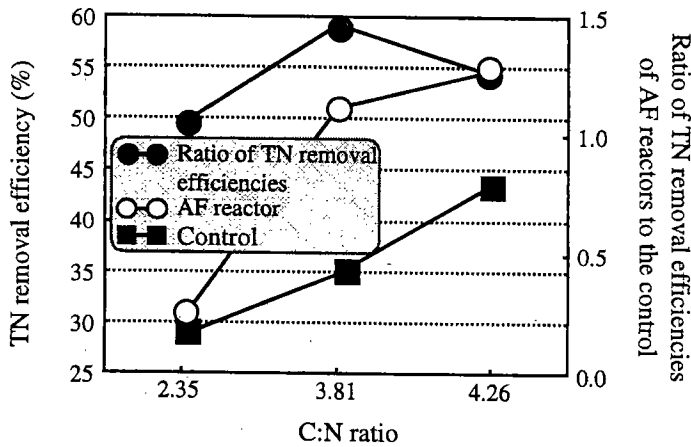
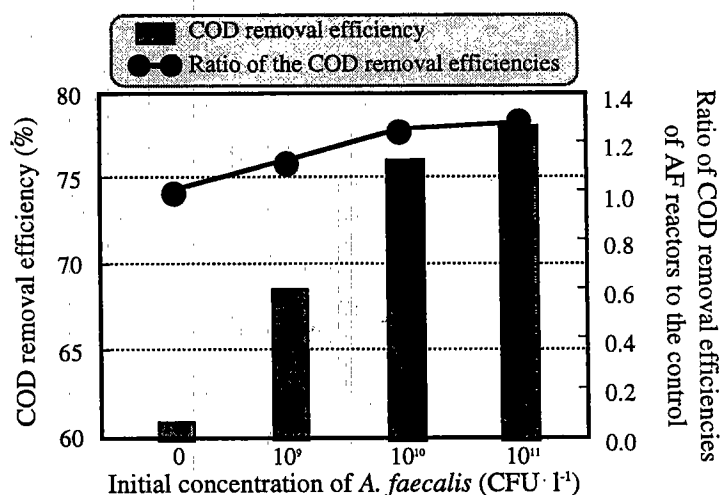


Figure 5 Average TN removal efficiency

4.4 *A. faecalis*のN₂O抑制効果の有効期間

図2と図4の示すように、およそ運転が安定になってから30日間 (*A. faecalis*が導入されてから2ヶ月間)に、AF反応装置から放出されたN₂O濃度が増え始めAF反応装置の全窒素除去率が低くなり始めた。このことは反応装置の窒素除去能とN₂O発生抑制能が低下し始めることの意味であった。他方、コントロールとしてAS反応装置より放出されたN₂O濃度と全窒素除去率は時間によって激しく変化しているが、AF反応装置のような連続した変化ではなかった。具体的にAmount Experimentsの実験系において、*A. faecalis*の量を10⁹CFU · l⁻¹、10¹⁰CFU · l⁻¹および10¹¹CFU · l⁻¹含むAF反応装置は第26日、第28日と第40日 (すなわち*A. faecalis*を導入して運転がはじめた後第56、58と70日)にN₂O濃度が増加し始め、第48、48と54日にAF反応装置から出るN₂O濃度がAS反応装置の放出されたN₂O濃度とほぼ同じ位になった。これは*A. faecalis*のN₂O発生抑制能の無くなることを示している。この現象によって、*A. faecalis*のN₂O発生抑制効果がおおよそ2ヶ月間続けられることと考えられる。このことから、第48、48と54日に各AF反応装置に実験のはじめた時同じ量の*A. faecalis*をもう一度添加した。図2の示すように、新しい*A. faecalis*を添加するに

(A) Amount Experiments



(B) CN Experiments

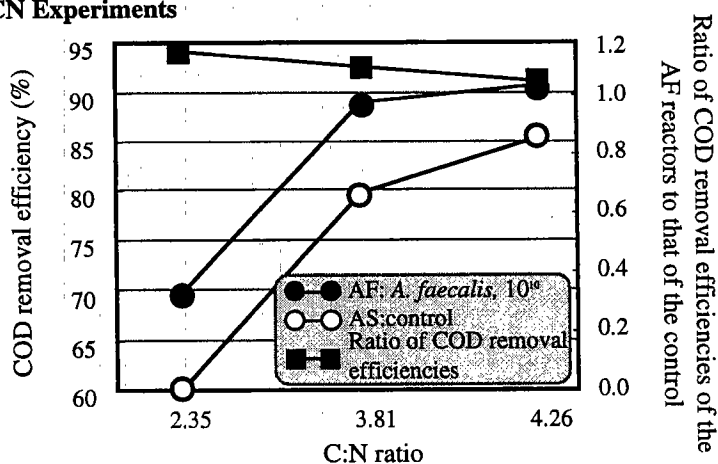


Figure 6. Average COD removal efficiency

よりAF反応装置の放出されたN₂O濃度が低くなり、それは継続された。COD:TNの影響の実験では、COD:TN比の4.26 : 1、3.81 : 1と2.35 : 1の三つの場合にA. faecalisの効果も78、78と68日間継続されることが明らかとなった。

以上の結果はA. faecalisが流出水と共にAF反応装置からヴォッシュアウトされ反応装置中の濃度が減少すること、またA. faecalisが導入された活性汚泥マイクロコズムの中で活性が低下或いは優占化率が低下することなどの理由と考えられた。この原因の解明のため迅速に測定できる、実用的なA. faecalis同定と測定手法の開発が非常に重要と考えられる。他方、前のA. faecalis固定された実験結果⁹⁾、好気条件下で、固定化したA. faecalisの効果を実験期間の4ヶ月間保持されたことから固定化法などによるA. faecalisの活性汚泥システム中への長時間高濃度化・密集化手法は必要と考えられる。

5. 本研究により得られた成果

嫌気条件下における活性汚泥の中へのA. faecalisの高濃度の添加は、N₂O発生量の削減および全窒素の除去能を高める上で効果的であった。またA. faecalis および活性汚泥の両

者を含む反応槽からの N_2O 発生量は、活性汚泥のみの系に比べて1/2以上に低下することが分かった。さらに平均の全窒素除去能は、約7~65%高まることが分かった。

本実験条件において高濃度の*A. faecalis*の添加および高いCOD:TNの比が N_2O 発生量の低下に効果的なことが分かった。浮遊状態で活用した*A. faecalis*添加では N_2O 発生量の削減および全窒素の除去能を高める効果はおよそ3ヶ月間は維持されることが明らかとなった。

以上より活性汚泥中の*A. faecalis*の量を増加することは、排水処理からの N_2O 放出を抑制する上で効果的なだけでなく、嫌気状態の下での窒素除去能を向上する上でも貢献することから、本微生物を用いたプロセスの更なる発展が重要なことが示唆された。更に、*A. faecalis*の挙動を詳しく解析するための実用的な同定・測定手法の開発、また、*A. faecalis*の高濃度を維持する固定化方法の検討を推進して行く重要性が明らかとなった。

6. 参考文献

- 1) 銭 易、鄭 興燦 (1993) 現代廃水処理技術、中国建築工業出版社、北京、1-3
- 2) Wu, X. L., Kong, H. N., Mizuochi, M., Inamori, Y., Huang, X. and Qian, Y. (1995) Nitrous oxide emission from microorganisms. *日本水処理生物学会誌* **31**: 151-160.
- 3) Manz, W., Wagner, M., Amann, R. and Schleifer, K.-H. (1994) In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants, *Wat. Res.* **28**: 1715-1723.
- 4) Otte, S., Grobber, N. G., Robertson, L. A., Jetten, M. and Kuenen, J. G. (1996) Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2421-2426.
- 5) Inamori, Y., Wu, X.-L. and Mizuochi, M. (1997) N_2O producing capability of *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradskyi* and *Alcaligenes faecalis*, *Water Science and Technology* **36**(10)
- 6) Wu, X.-L., Inamori, Y. and Mizuochi, M. Greenhouse gas- N_2O production by *Alcaligenes faecalis*, Proceedings of 2nd International Conference on Microorganisms in Activated sludge and Biofilm Processes, Berkeley, California, USA, July 21-24, 1997
- 7) Wu, X.-L., Inamori, Y. and Mizuochi, M. Greenhouse gas- N_2O production by *Alcaligenes faecalis*, a typical nitrifying denitrifier, under anoxic conditions, Proceedings of 8th International Conference on Anaerobic Digestion, Sendai, Japan, May 24-27, 1997
- 8) Wu, X.-L., Inamori, Y. and Mizuochi, M. Contribution of *Alcaligenes faecalis*-a nitrifying denitrifying bacterium to N_2O emission in activated sludge process, Proceedings of 7th International Workshop on N_2O Emission, Cologne, Germany, April 21-23, 1997
- 9) Hanaki, K., Zheng, H. and Matuso, T. (1992) Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater, *Wat. Sci. Technol.*, **26**:1027-1036.
- 10) APHA-AWWA-WPCF, (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed., Pp 908-912, Washington D.C, U. S. A
- 11) Roy, R. and Knowles, R. (1994) Effects of methane metabolism on nitrification and nitrous

Oxide production in polluted freshwater sediment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 3307-3314

12) 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局水道環境部監修 (1997) 下水試験方法 (上巻)、147-153、社団法人日本下水道協会、東京

研究成果の発表状況

(1) 口頭発表

- ① Inamori, Y., Wu, X.-L., Mizuochi, M., Nakamura, E., Odaka, M., Suzuki, Y. and Tsuruta, H. Control of anthropogenic N₂O-a greenhouse gas-emission from several man-related fields, Proceedings of the 7th Japanese-German Workshop on Wastewater and Sludge Treatment, Kyoto, Japan, Dec 11-12, 1997
- ② Wu, X.-L., Inamori, Y. and Mizuochi, M. Greenhouse gas-N₂O production by *Alcaligenes faecalis*, Proceedings of 2nd International Conference on Microorganisms in Activated sludge and Biofilm Processes, Berkeley, California, USA, July 21-24, 1997
- ③ Wu, X.-L., Inamori, Y. and Mizuochi, M. Greenhouse gas-N₂O production by *Alcaligenes faecalis*, a typical nitrifying denitrifier, under anoxic conditions, Proceedings of 8th International Conference on Anaerobic Digestion, Sendai, Japan, May 24-27, 1997
- ④ Wu, X.-L., Inamori, Y. and Mizuochi, M. Contribution of *Alcaligenes faecalis*-a nitrifying denitrifying bacterium to N₂O emission in activated sludge process, Proceedings of 7th International Workshop on N₂O Emission, Cologne, Germany, April 21-23, 1997
- ⑤ Inamori, Y., Wu, X.-L., Mizuochi, M., Odaka, M., Suzuki, Y., Tsuruta, H. Study on development and assessment of strategy and technology for control greenhouse gases CH₄ and N₂O, Proceedings of 7th International Workshop on N₂O Emission, Cologne, Germany, April 21-23, 1997
- ⑥ Wu, X.-L. and Inamori, Y. Reducing N₂O Emission by Adding Immobilized *Alcaligenes faecalis* into Intermittent Aeration Activated Sludge System, 第32回日本水環境学会年会, 1998. (in English).
- ⑦ Wu, X.-L., Inamori, Y. and Kimochi, Y. Factors affecting N₂O emission from an activated sludge system with *Alcaligenes faecalis* introduced into under anoxic conditions, 第34回日本水処理生物学会年会, 1996. (in English).
- ⑧ Wu, X.-L., Inamori, Y. and Mizuochi, M. Behaviors of heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis* to N₂O emission in activated sludge process under aerobic conditions, 第31回日本水環境学会年会, 1997. (in English).
- ⑨ Wu, X.-L., Inamori, Y. and Mizuochi, M. N₂O Production by *Alcaligenes faecalis*, a Nitrifying Denitrifier, 第33回日本水処理生物学会年会, 1996. (in English).

⑩ Wu, X.-L., Inamori, Y., Mizuochi, M. and Kong, H.-N., Behaviors of Nitrifying and Denitrifying Biofilm towards N₂O emission, 第32回日本水処理生物学会年会, 1996. (in English).

(2) 論文発表

① Inamori, Y., Wu, X.-L. and Mizuochi, M.(1997) N₂O producing capability of *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradskyi* and *Alcaligenes faecalis*, *Water Science and Technology* 36(10).

② Wu, X. L., Kong, H. N., Mizuochi, M., Inamori, Y., Huang, X. and Qian, Y. (1995) Nitrous oxide emission from microorganisms. *日本水処理生物学会誌*, **31**: 151-160.