

畜産 2 次処理排水中の窒素とリンの除去・回収

県立広島大学 大学院

総合学術研究科

生命システム科学専攻

博士論文

平成 29 年 3 月

(2017 年)

赤木 孝太郎

目次

第 1 章 緒論	1
1-1 はじめに	2
1-2 畜産汚水の富栄養化物質および処理法	2
(1) 畜舎汚水処理の状況	
(2) 畜産 2 次処理排水中の窒素とリンの特性	
(3) 汚水処理を構成する基本工程	
(4) 活性汚泥法を利用した 2 次処理の工程	
1-3 小規模農家の排水処理の現状と今後	4
(1) 小規模農家の排水処理の実態	
(2) 窒素およびリンの簡易的な処理方法の検討	
1-4 本研究の目的	6
第 2 章 水質浄化資材を用いた排水中の窒素除去	10
2-1 はじめに	11
2-2 水質浄化資材による畜産 2 次処理排水中の窒素除去	12
2-2-1 実験材料と方法	12
(1) 水質浄化資材と排水処理装置	
(2) 水質浄化資材により処理した畜産 2 次処理排水中の成分分析	
2-2-2 結果と考察	12

2-3	合成排水を用いた水質浄化資材の処理評価	14
2-3-1	実験材料と方法	14
	(1) 合成排水の組成と処理方法	
	(2) 水質浄化資材により処理した合成排水中の成分分析	
	(3) 水質浄化資材によるアンモニウムと硝酸イオン吸着能の評価	
2-3-2	結果と考察	16
2-4	水質浄化資材に担持された微生物の解析	19
2-4-1	実験材料と方法	19
	(1) 合成排水中で増殖した微生物の単離方法	
	(2) 遺伝子解析技術による分離菌株の同定	
	(3) グラム染色による分離菌株の形態観察	
2-4-2	結果と考察	21
2-5	<i>Cronobacter</i> の窒素処理能の評価	26
2-5-1	実験材料と方法	26
	(1) <i>Cronobacter</i> の増殖曲線および検量線の作成	
	(2) <i>Cronobacter</i> の培養と液中の成分分析方法	
2-5-2	結果と考察	27
	(1) 世代時間毎の <i>Cronobacter</i> の生菌数	
	(2) 糖類および有機酸培地中での <i>Cronobacter</i> による窒素処理	
2-6	動物性堆肥からの酵母菌の取得	31
2-6-1	実験材料と方法	31
	(1) 動物性堆肥中の酵母菌の単離と同定方法	
	(2) 単離した酵母菌のアンモニウム処理能の評価	

2-6-2	結果と考察	32
	(1) 単離した酵母菌の形態観察および ITS 領域の塩基配列解析	
	(2) 単離した酵母菌のアンモニウム処理能	
2-7	<i>Cronobacter</i> と <i>Candida</i> の混合培養によるアンモニウム処理	35
2-7-1	実験材料と方法	35
	(1) <i>Cronobacter</i> と <i>Candida</i> の培養方法	
	(2) 混合培養液中の成分分析と菌の観察	
2-7-2	結果と考察	36
2-8	まとめ	36
第3章	MPP 晶析法によるリンとカリウムの同時回収	39
3-1	はじめに	40
3-2	MPP 生成における最適 pH の検討	41
3-2-1	実験材料と方法	41
	(1) 模擬畜産排水の組成と反応条件	
	(2) 模擬畜産排水および沈殿物の成分分析・結晶形の観察	
3-2-2	結果と考察	42
	(1) 中性から塩基性下での MPP 生成	
	(2) 各設定 pH で回収された PO ₄ -P	
3-3	強塩基性下での MAP の晶析評価	46
3-3-1	実験材料と方法	46
	(1) アンモニウム含有排水の組成と反応条件	
	(2) アンモニウム含有排水および沈殿物の成分分析・結晶形の観察	

3-3-2	結果と考察	46
3-4	硝酸イオンの共存による MPP 生成への影響	48
3-4-1	実験材料と方法	48
	(1) 硝酸イオン含有排水の組成と反応条件	
	(2) 硝酸イオン含有排水および沈殿物の成分分析・結晶形の観察	
3-4-2	結果と考察	48
3-5	硫酸イオンの共存による MPP 生成への影響	50
3-5-1	実験材料と方法	50
	(1) 硫酸イオン含有排水の組成と反応条件	
	(2) 硫酸イオン含有排水および沈殿物の成分分析・結晶形の観察	
3-5-2	結果と考察	50
	(1) 硫酸イオン濃度の変化による MPP 生成への影響	
	(2) 硫酸イオン存在下で生成された白色沈殿物の分析	
3-6	低濃度 $\text{PO}_4\text{-P}$ およびカリウム条件による MPP 生成	54
3-6-1	実験材料と方法	54
3-6-2	結果と考察	54
	(1) 低濃度 $\text{PO}_4\text{-P}$ 排水中からの MPP 生成	
	(2) 低濃度カリウム排水中からの MPP 生成	
3-7	連続試験による MPP 生成の検討	58
3-7-1	実験材料と方法	58
	(1) 連続試験装置の設置と操作方法	
	(2) 連続処理排水と沈殿物の成分分析・結晶形の観察	

3-7-2 結果と考察	58
(1) 連続試験装置による模擬畜産排水中の $\text{PO}_4\text{-P}$ とカリウム除去	
(2) 反応槽と沈殿槽から回収された白色沈殿物の成分分析	
3-8 まとめ	59
第4章 総括	62
参考文献	65
謝辞	72
付録	73

第 1 章 緒論

1-1 はじめに

畜舎から発生する汚水中には、富栄養化物質の窒素とリンが高濃度で存在するため水質汚濁防止法により各成分の排水基準が設定されている。しかし、畜産事業所の規模や季節によって基準値より高めの窒素とリンを含む畜産 2 次処理排水が環境中に放出されることによる公共用水域の特に内湾や湖沼といった閉鎖性水域の富栄養化が問題となっている。本章では畜産 2 次処理排水中に残留する窒素およびリンの実態、また、これら富栄養化物質に対する従来の処理法について提言する。

1-2 畜舎汚水の富栄養化物質および処理法

(1) 畜舎汚水処理の状況

畜舎汚水中には、家畜の糞尿、乳脂質、抗生物質、畜舎洗浄時に使用した洗剤が含まれており、適切に堆肥化および焼却処理後、圃場に還元し有効利用されている。しかし、圃場面積が小さく、1 戸当たりの飼養頭羽数の多い我が国の畜産経営において、大規模な畜舎汚水処理設備を設置することは困難なため、自家圃場への還元は一部しかされず、大部分は環境中に放出される【1】。畜舎汚水には窒素やリンといった富栄養化物質が多く含まれており、未処理の汚水が畜舎周辺の土壤中に流出した場合、地下水汚染の原因となる【1】。法的にも、一定規模以上の畜産事業所は水質汚濁防止法（第 3 条）で特定施設に指定され、ここから排出される畜舎排水は環境省により一定の水質基準が設定されている【2】。すなわち、家畜糞尿や畜舎清掃排水を含んだ畜舎汚水を公共用水域に放流する場合、所定の水質を満たすように処理することが義務付けられている。さらに平成 13 年 7 月には、水質汚濁防止法に基づき排水中の硝酸性窒素が人の健康に害を与えるとして、環境省は環境基準（硝酸性窒素および亜硝酸性窒素：10mg/L 以下）を設け、これは規模によらず対応を要求される【2】。

具体的な基準として生活環境項目は、50m²以上の豚房、200m²以上の牛房、500m²以上の馬房排水で 1 日当たりの平均排水量 50m³/日以上が規制の対象となり、pH（海域以外の公共用水域：pH 5.8 から pH 8.6、海域：pH 5.0 以上から pH 9.0 以下）、生物化学的酸素要求量（BOD：160mg/L）、化学的酸素要求量（COD：160mg/L）、浮遊物質（SS：200mg/L）、大腸菌群数（CFU：3,000 個/ml）は全国一律で、窒素とリン含有量は環境庁告示（第 27 号、第 66 号）により一般排水基準（窒素 120mg/L、リン 16mg/L）と暫定排水基準（窒素 170mg/L、リン 25mg/L）に適用されている【3】。また、平成 28 年 7 月以降、健康項目はアンモニア、アンモニウム化合物、亜硝酸化合物および硝酸性化合物の一律排水基準（100mg/L）と暫定排水基準（畜産農業：600mg/L）が適用され、特に亜硝酸化合物は水中の酸素と強く結合し、人体や水生生物に悪影響を与えることから、今後、さらに排水基準が厳正化すると予想される【4】。畜産農業における特定事業所登録件数は約 30,000 件になり、その内の約 400 件が水質汚濁防止法の生活環境項目（窒素：120～170mg/L、リン：16～25mg/L）に該当し、残りは健康項目（100～600mg/L）に適用される小規模施設であることから、日々、処理が不十分な畜産 2 次処理排水の発生の可能性が考えられる【5】。

(2) 畜産 2 次処理排水中の窒素とリンの特性

畜産 2 次処理排水中の窒素は、有機態窒素 (ORG-N)、アンモニウム態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$)、亜硝酸態窒素 ($\text{NO}_2\text{-N}$)、硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) の形態で存在し、各地域の畜産農家から排出される窒素成分濃度の調査によると、九州地方の豚舎で発生した活性汚泥処理水中の全窒素 (TN) は 110mg/L であり、その内の $\text{NH}_4\text{-N}$ は 62mg/L、 $\text{NO}_2\text{-N}$ は 22mg/L、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は 26mg/L 含まれていた。また、神奈川県で発生した処理水中の硝酸性化合物は健康項目の暫定排水基準 (平成 17 年度 : 900mg/L) を超えていなかったが、生活環境項目の一般排水基準 (平成 17 年度 : 120mg/L) においては 60 検体中 27 検体が基準値を満たしておらず、処理水中の窒素を形態別に割り当てると ORG-N は 37%、 $\text{NH}_4\text{-N}$ は 44%、 $\text{NO}_2\text{-N}$ は 3%、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は 16% を占めていた【6】(図 1-1)。九州地方と神奈川県の畜産 2 次処理排水中に残留する窒素成分の分析結果から $\text{NH}_4\text{-N}$ の残存量が最も多く、排水基準を満たすためには $\text{NH}_4\text{-N}$ を優先的に処理することが重要であると考えられた【7】。

リンの処理については高度処理を検討しており、東京都の畜舎から排出される畜産 2 次処理排水中のリンは東京都環境確保条例に係る基準値 (16mg/L) を超えていることから、対策として塩化鉄を用いた凝集沈殿処理により排水中のリンを 1mg/L まで除去・回収している【3】【6】。また、神奈川県の小規模農家は回分式浄化槽と連続式浄化槽により原水を処理後、処理水中には平均 8.3mg/L のリンが残存しており、通電透析法および晶析法の高度処理によるリン回収が検討されている【7】【8】。排水中のリン回収を主流としている理由は、リンが化学肥料の材料や工業原料として使用される有用資源であり、米国地質調査所 (United States Geological Survey : USGS) によると数十年後には埋蔵されているリン鉱石 (約 180 億トン) の枯渇が懸念されているためである (図 1-2)【9】【10】。そして、畜産農業において年間で発生する排水中には総計 10.98 万トン (糞 : 9.92 万トン、尿 : 1.06 万トン) のリンが含まれており、再利用可能な方法で高度処理することが望まれている【11】【12】。

(3) 汚水処理を構成する基本工程

畜舎汚水は、1 次処理、2 次処理および汚泥処理の工程を経て処理され、必要な場合には高度処理が付加される【13】【14】(図 1-3)。1 次処理では、汚水中の砂粒や SS といった固形物を沈殿分離、浮上分離、ふるいやスクリーンにより除去する。2 次処理は、1 次処理で取り除けなかった汚水中の有機物を微生物により分解する。方法としては、酸素を十分に満たした好気槽での簡易曝気処理や活性汚泥処理、また、無酸素状態にした嫌気槽でのメタン発酵処理が挙げられる。畜舎汚水中の窒素のほとんどは、好気性微生物 (硝化菌) と嫌気性微生物 (脱窒菌) を好気槽と嫌気槽に分けて生物処理される。しかし、リンにおいては高度処理を付加しなければ、排水基準を満たすことが難しく、健康項目の窒素において有害物質に指定されている硝酸性化合物は $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の合計で見積もられているため、処理水中に残留する窒素形態に応じて高度処理する必要がある【4】。

(4) 活性汚泥法を利用した 2 次処理の工程

2 次処理では、様々な種類の微生物の集合体である活性汚泥により排水中の有機物、窒素を処理する方法が主流となっている【12】【15】。活性汚泥法は、排水中の有機物（ORG）を分解するための嫌気槽、そして、主に $\text{NH}_4\text{-N}$ を $\text{NO}_2\text{-N}$ および $\text{NO}_3\text{-N}$ に変換させる好気槽（曝気槽）に区分されており、曝気槽で生成された $\text{NO}_2\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ は再び嫌気槽で窒素ガス（ N_2 ）に変換後、環境中に放出する処理システムで構成されている【15】【16】（図 1-4）。曝気槽では、活性汚泥中の好気性微生物が排水中の酸素（ O_2 ）と有機物と窒素を利用して増殖するため、浄化槽内には空気を送り込むためのブロワーが設置される。嫌気槽では、嫌気性微生物が無酸素条件下で曝気槽から流入される $\text{NO}_2\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ を N_2 変換し、その際に排水中の有機物を分解、また、嫌気性微生物の脱窒作用を高めるため、意図的に有機物を添加する。リンの処理では、活性汚泥が排水中のリンを細胞内で高分子化（ポリリン酸）し、水素供与体として有機物を嫌気条件下で細胞内に蓄積したポリリン酸を取り出し回収する方法が報告されている【17】。

曝気槽内では $\text{NO}_2\text{-N}$ が $\text{NO}_3\text{-N}$ を処理過程において上回ることがあり、そのまま湖沼や河川といった水域に放出すると、高濃度の $\text{NO}_2\text{-N}$ が水中の酸素（ O_2 ）と反応し酸素欠乏を引き起こすことから、環境省は特定事業所から排出される $\text{NO}_2\text{-N}$ の排水基準を厳しく定めている【4】【5】。よって、高濃度の $\text{NH}_4\text{-N}$ を含む畜産排水処理では、曝気槽と嫌気槽の設置のために農家は経営耕地面積の増加、また、曝気時の電気代や装置の維持管理費（ランニング・コスト）を掛けて経営している。排水基準の生活環境項目に適用する畜産農家（排水量： $50\text{m}^3/\text{日}$ 以上）が活性汚泥法により排水処理した場合、処理装置の規模にもよるが総消費電力からランニング・コストを含めて合計約 860 万円/年かかることから、活性汚泥法に比べ維持管理費を削減できる生物膜法への転換が検討されている【16】【18】。

1-3 小規模農家の排水処理の現状と今後

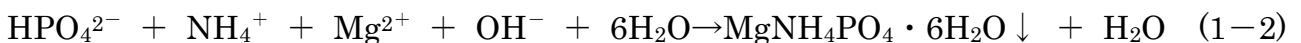
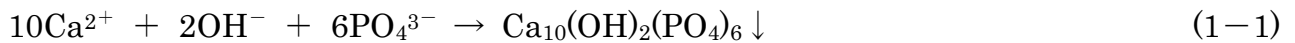
(1) 小規模農家の排水処理の実態

日本では経営耕地面積が 30a 以上の販売農家は、平成 22 年の時点で約 160 万戸、その内の 5ha 未満の耕地面積を所有する小規模農家は 9 割以上を占めている（図 1-5）【4】。日本が飼養する哺乳類の家畜の中で飼養数が最も多いのは豚であり、30a 以上の畜産農家が飼養できる豚頭数は 15 頭と農林水産省により報告されており、また、5ha 以上の大規模農家は飼養豚（300 頭から 800 頭）から発生する污水（ $30\text{m}^3/\text{日}$ から $80\text{m}^3/\text{日}$ ）を処理するために、約 6,000 万円から 9,000 万円の浄化処理装置の設置、設置後の約 480 万円から 720 万円/年のランニング・コストを支払っている【19】。しかし、図 1-5 によりほとんどの小規模農家の年間所得がランニング・コスト以下であり、また、農地の規模の大小に比例して建設費が変動しないため浄化処理の設置は負担と手間を増やすことから、小規模農家は大規模農家との農地のシェアや農業集落排水処理施設の利用が余儀なくされる【19】。しかし、排水基準が厳正化されたことで、農業集落排水処理施設の利用だけではリンや窒素といった富栄養化物質の排水基準を満たすことが困難となり、今後、多くの小規模農家から排水基準を超える畜産 2 次処理排水が環境中へ放出されると考えられる。

(2) 窒素およびリンの簡易的な処理方法の検討

図 1-5 の小規模農家の経済状況において畜産 2 次処理排水中の窒素およびリンの簡易的な処理法を必要とすることから、水中の $\text{NH}_4\text{-N}$ およびリンの除去・回収技術の開発が推進されている。まず $\text{NH}_4\text{-N}$ 処理法では、生物膜処理法とエコバイオ・ブロック (EBB) による窒素変換除去が注目されている【21】【22】。前者の生物膜処理法は、農業集落排水といった比較的小規模な排水処理施設に多く採用されており、活性汚泥法と比べ汚水の減水による負荷低減と余剰汚泥の発生が少ない利点を持つ【21】。原理としては、小型の浄化槽に微生物膜を形成させた担体を投入し汚水と接触させることで、生物膜上層の好気性微生物が酸素と電子供与体の ORG の利用により $\text{NH}_4\text{-N}$ を $\text{NO}_3\text{-N}$ に酸化後、下層の嫌気性微生物により $\text{NO}_2\text{-N}$ から N_2 に還元し汚水中の窒素を除去するが、畜舎汚水の SS や微生物の死骸により根詰まりを引き起こす (図 1-6)。後者の EBB は、コンクリートブロックに担持させた枯草菌 (*Bacillus*) の一種の納豆菌 (*Bacillus subtilis*) により汚水中の有機物を分解させながら、 $\text{NH}_4\text{-N}$ を $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ に変換する。生物膜処理法と同様担体に納豆菌群の生物膜を形成させ処理する方式であり、用水路や湖沼の水質浄化に使用されている。しかし、農業用水路といった窒素を多く含む環境下での窒素除去法に関する学術的報告例は無く、また、水中の酸素と強く結合する $\text{NO}_2\text{-N}$ による水生生物への悪影響が懸念されている【22】。

つぎにリンにおいては、金属塩含有の薬液を処理水中に投液し汚水中のリン酸イオン (PO_4^{3-} 、 HPO_4^{2-}) と結晶化させる晶析法が挙げられ、式 (1-1) や式 (1-2) のヒドロキシアパタイト (HAP : $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$) やリン酸マグネシウムアンモニウム (MAP : $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) として回収し、そのまま植物の肥料として再利用する【14】【20】。



しかし、HAP 法では、他の晶析法に比べ多量の金属塩溶液といった薬液の使用および厳正な pH (pH 8 から pH 9) 管理を必要とする。MAP 法は、弱アルカリ性下でマグネシウム (Mg^{2+}) 塩と HPO_4^{2-} 、 NH_4^+ を反応させるため、高濃度のリンと窒素を含む畜産排水への使用に適しており、また、MAP 中には植物の栄養素であるリンと窒素を含んでいることから晶析法の中でも採用実績が多い。しかし、リン酸イオンと NH_4^+ 、金属塩 (Mg^{2+} 、 Ca^{2+}) を多く含む豚舎汚水の処理では、高度処理前の 2 次処理の浄化槽で MAP や HAP が生成され、浄化設備の配管系の閉塞といったトラブルを引き起こす【20】。原因は、2 次処理における活性汚泥の使用やエアレーションによる pH 上昇が考えられており、対策として 2 次処理前に MAP 生成装置の設置を考案しているが、処理工程の前後に新たな装置を追加するため、農家に与える負担が大きくなる。

1-4 本研究の目的

我が国の畜産農家の大部分は高度処理装置の設置が経済的に困難なため、一部の地域から排出される畜産 2 次処理排水中の窒素とリンが水質汚濁防止法の排水基準を超え、公共用水域の富栄養化の発生要因と考えられている。従来の簡易的処理法には、窒素では微生物の生物膜や窒素代謝能を利用した処理法について報告されているが、新しい処理装置の付加によるランニング・コストの増加や $\text{NH}_4\text{-N}$ に対する処理効果が低いと考えられた。リンの回収においては金属塩との反応により結晶化させる晶析法が多く採用されており、畜舎汚水の 2 次処理の前段階に晶析装置を設置し処理されているが、畜産 2 次処理排水中のリンを対象とした除去と回収についての報告例は少ない。よって、本研究では畜産 2 次処理排水中の $\text{NH}_4\text{-N}$ およびリンを効果的に処理するため、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 処理では市販の水質浄化資材や環境中から単離した微生物の利用、また、リンの回収では塩化マグネシウムを用いた晶析法の最適処理条件を検討した。

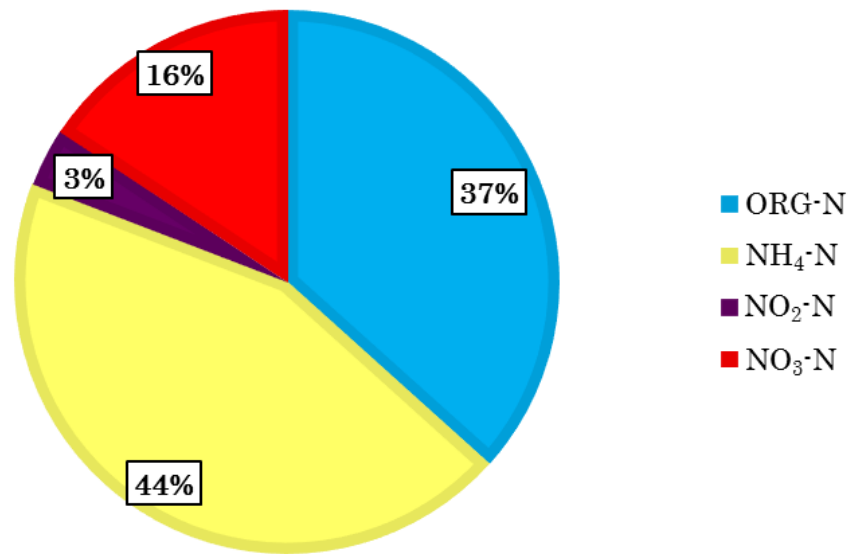


図 1-1 神奈川県で発生した家畜用浄化槽処理水中の形態別窒素の割合
出典：田邊（2005）を参考に作成

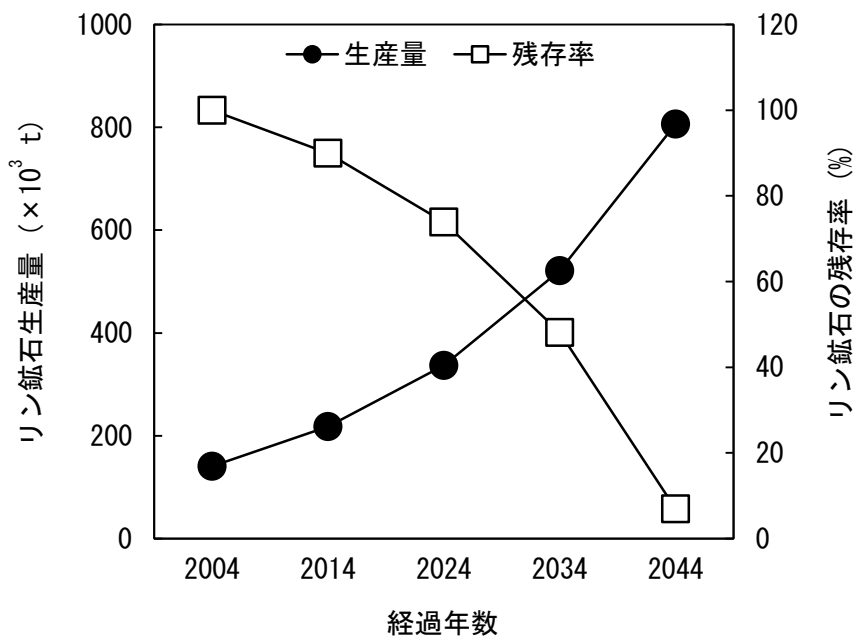


図 1-2 世界のリン鉱石の生産量および残存量の傾向
出典：Sally Jewell (2016) を参考に作成

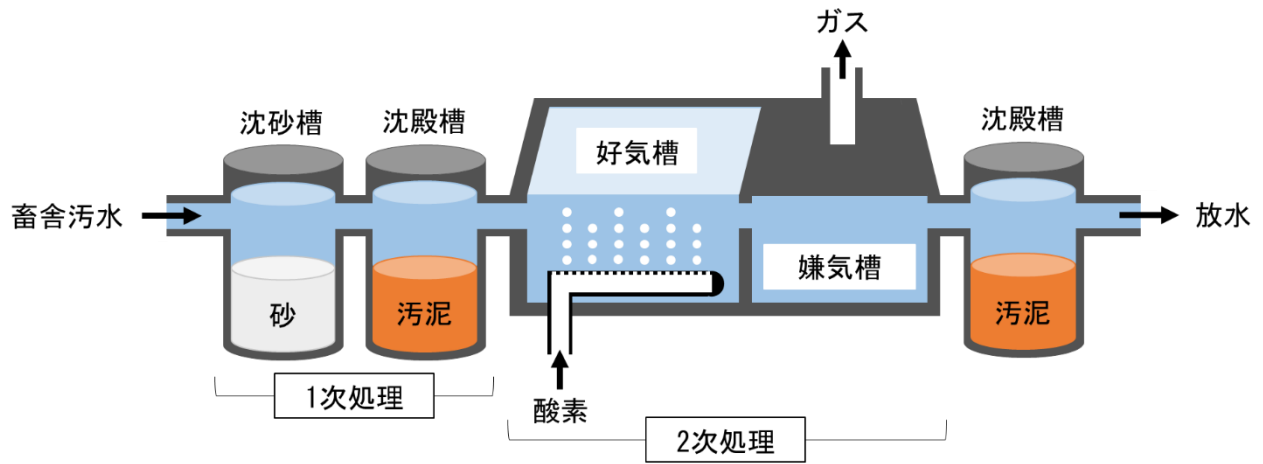


図 1-3 畜舎汚水の処理工程

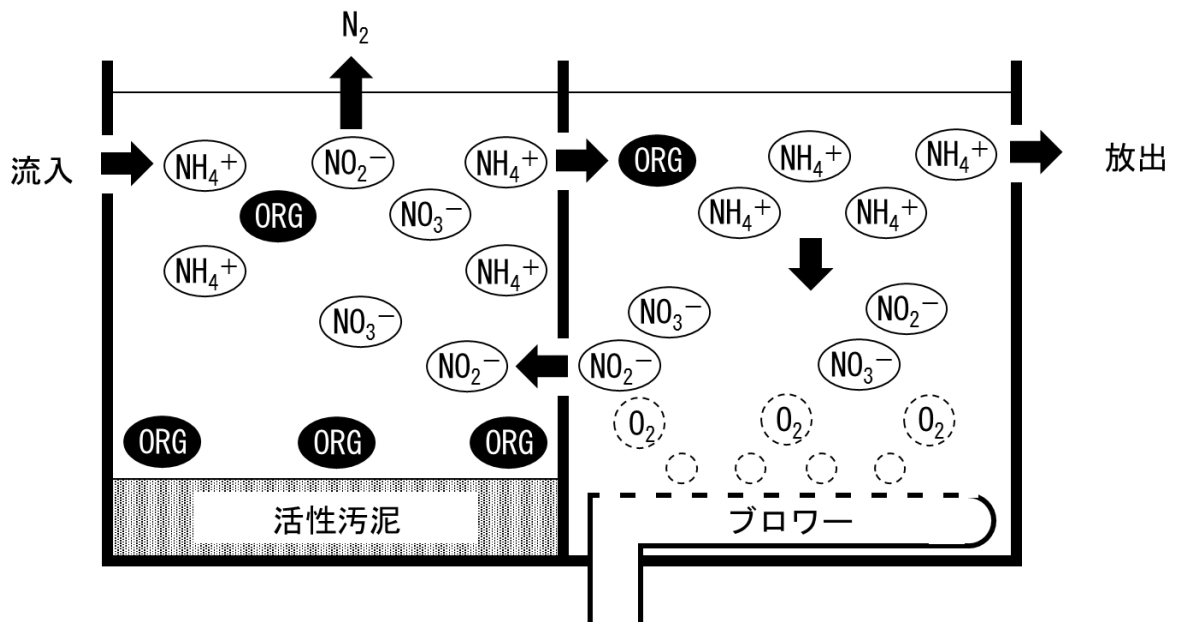


図 1-4 活性汚泥を利用した畜産排水の硝化脱窒処理

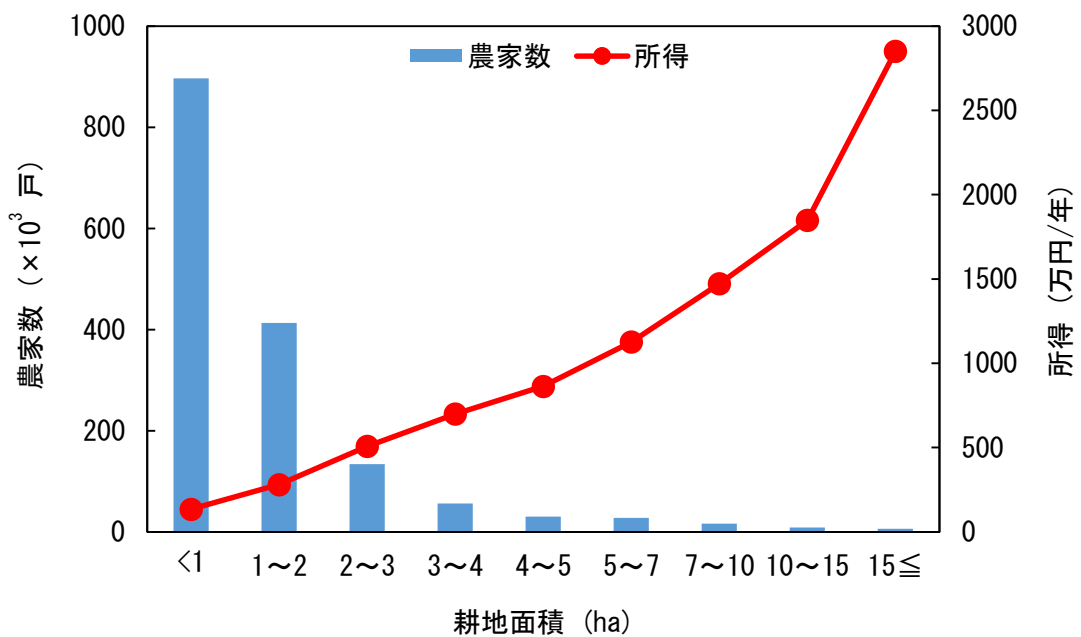


図 1-5 平成 22 年の 1ha 未満から 15ha 以上の耕地面積を保有する農家数
 出典：農林水産省 (2016) を参考に作成

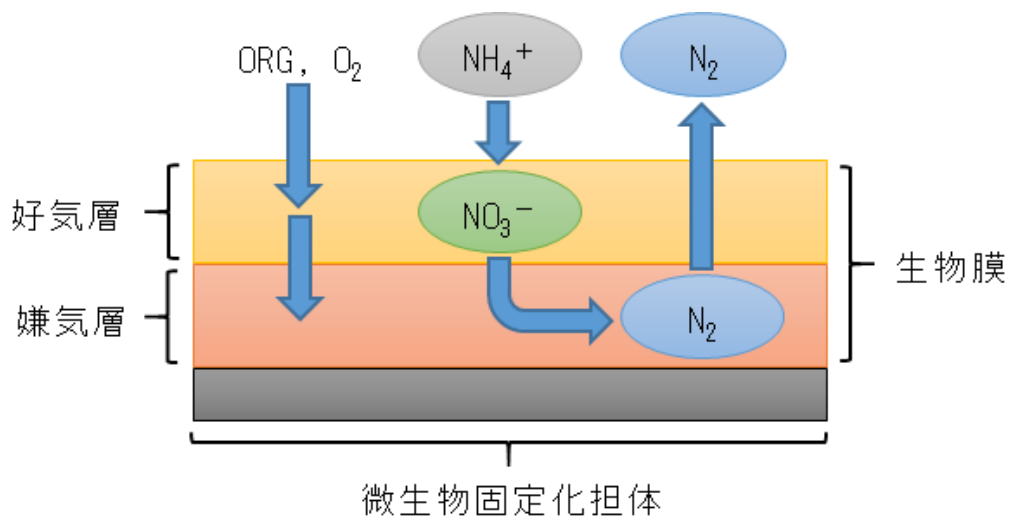


図 1-6 生物膜処理法による汚水中の ORG および NH₄⁺除去

第2章 水質浄化資材を用いた排水中の窒素除去

2-1 はじめに

畜産業に関わる排水基準において、生活項目については畜舎の総面積および平均排水量の規模によって適用され、健康項目では排出量が小さくても適用の範囲となる【4】。平成28年から、畜産業における排水基準は有害物質のアンモニア、アンモニウム化合物、亜硝酸および硝酸性化合物の暫定排水基準が600mg/Lと厳しく定められ、大規模農家は高度処理装置の設置により畜産2次処理排水中の窒素を排水基準まで除去している【4】。しかし、我が国の農家数の9割以上は小規模農家で占めており、大規模農家と比べ小面積、且つ低所得な小規模農家に従来の高度処理装置を設置するには負担が大きいことから、主に農業集落排水処理施設の利用、また、微生物固定化担体の投入による汚水中の窒素除去が報告されている【19】【23】【24】。農業集落排水処理施設では、主に好気性微生物と嫌気性微生物を繊維や多孔質担体に付着させた生物膜法により排水中の窒素を処理しているが、浮遊物質(SS)による目詰まりを防止するための固液分離施設、また、散床や曝気装置を必要とするため、小規模農家への設置は難しい【19】。よって、小規模の浄化槽に竹炭や炭素繊維ろ材といった微生物固定化担体を投入し微生物の分解能の向上、また、納豆菌(*Bacillus subtilis*)をコンクリートブロックに担持させたエコバイオ・ブロック(EBB)を用水路や閉鎖性水域に設置することで水中の脱窒能を高めている【22】【23】【24】。竹炭といった炭化バイオマスは、塩基性官能基を持つ物質とイオン交換性の化学吸着を起こし、排水中の亜硝酸イオン(NO_2^-)と硝酸イオン(NO_3^-)を吸着除去、また、炭化バイオマスに付着した微生物によって吸着物質を分解し、吸着能を再生させる処理法が報告されている【23】。しかし、竹炭には、畜産2次処理排水中の窒素の大部分を占めるアンモニウム(NH_4^+)の吸着能がほとんどなく、有機体窒素を多く含む排水での使用は NH_4^+ の蓄積に繋がる【23】【25】。対してEBBは、水中の NH_4^+ を微生物の硝化作用により NO_2^- と NO_3^- に変換するが、 NO_2^- は水生生物にとって有毒であるため、 NO_2^- および NO_3^- 変換後の処理が課題となっている【22】。本章では、畜舎から排出される畜産2次処理排水中の NH_4^+ 除去に適切な処理法を確立するため、炭化パレットに様々な種属の微生物を担持させた水質浄化資材により、鹿児島県で採取した農業用水路の排水および100mg/L NH_4^+ 含有の合成排水を処理することで、その効果を確認した。平成22年の時点で農家一戸当たりの耕地面積は、東北(2.00ha)、北陸(1.76ha)、北関東(1.73ha)、沖縄(1.61ha)、南九州(1.59ha)地方の順に高く、南九州の鹿児島県K市では小規模農家による畜産業が盛んなことから、近辺の貯水池や湖沼の水質に悪影響を与えていることが考えられる【4】。そして、今までに100mg/L以上の NH_4^+ を含む農業排水を処理対象とし、また、排水中の微生物の学術的分類と機能評価について詳細に検証された報告例が少ないことから、本実験では高濃度の NH_4^+ 含有排水中で増殖した微生物の単離と遺伝子解析技術による同定を行った。そして、高濃度の窒素を含む動物性堆肥から酵母菌を単離し、水質浄化資材に担持された微生物との混合培養により排水中の NH_4^+ を処理した。動物性堆肥中には、悪臭の原因となるアンモニウム化合物を低減化させる微生物が生息しており、その環境下から取得した酵母菌との集積培養法により畜舎汚水ではパーラー排水、他の産業排水では重油や蒸留廃液中の窒素と有機物の分解促進が報告されていることから、本研究においても酵母菌の使用により畜産2次処理排水中の NH_4^+ 処理の向上を試みた【26】【27】【28】【29】。

2-2 水質浄化資材による畜産2次処理排水中の窒素除去

2-2-1 実験材料と方法

(1) 水質浄化資材と排水処理装置

本実験で使用した水質浄化資材は、パレットを700℃で炭化した担体（細孔分布：1.6～1.7nm）に、水質浄化能を持つ微生物と増殖のための栄養源（有機炭素：約65mg/L/個）を付着後、コンクリートで円柱状（比表面積：350m²/g）に固めてある。この水質浄化資材を市販の水切りネットで覆い、1L ビーカーと攪拌子、ホットスターラー（ASONE社製：RSH-1DN）で組み合わせた排水処理装置の中層付近に固定した（図2-1）。

(2) 水質浄化資材により処理した畜産2次処理排水中の成分分析

処理対象の畜産2次処理排水は2015年7月から8月に鹿児島県K市の農業用水路で採水した。また、採取した畜産2次処理排水中の全窒素（TN）、全炭素（TOC）、色度、pHを測定後、排水1Lを図2-1の排水処理装置で8日間攪拌処理（水温35℃、400rpm）し、処理排水の一部をADVANTEC社製のプラスチックホルダー（PP-25）とメンブレンフィルター（細孔径：0.45μm）で濾過した。そして、濾液中のTNおよびTOCをTOC計（島津社製：TOC-L）、色度を水質分析計（KYORITSU社製：Lambda-9000）、pHをpHメーター（HORIBA社製：D-52）で測定した。

2-2-2 結果と考察

図2-1の水質浄化資材を組み合わせた排水処理装置により、鹿児島県K市の農業用水路で採取した畜産2次処理排水（TN：115.9mg/L、TOC：43.6mg/L、色度：493、pH：6.39）を処理したところ、TNは77.4%（115.9mg/L→26.2mg/L）、また、色度は34.3%（493→324）除去され、視覚的にも明確な脱色を確認した（図2-2）。畜産2次処理排水の色度は処理後の指標となるため、活性炭やオゾンガスを用いた高度処理により脱色されるが、脱色剤が高価、または有毒性があるため使用上での大きな処理コストと危険性を伴う【18】【23】。

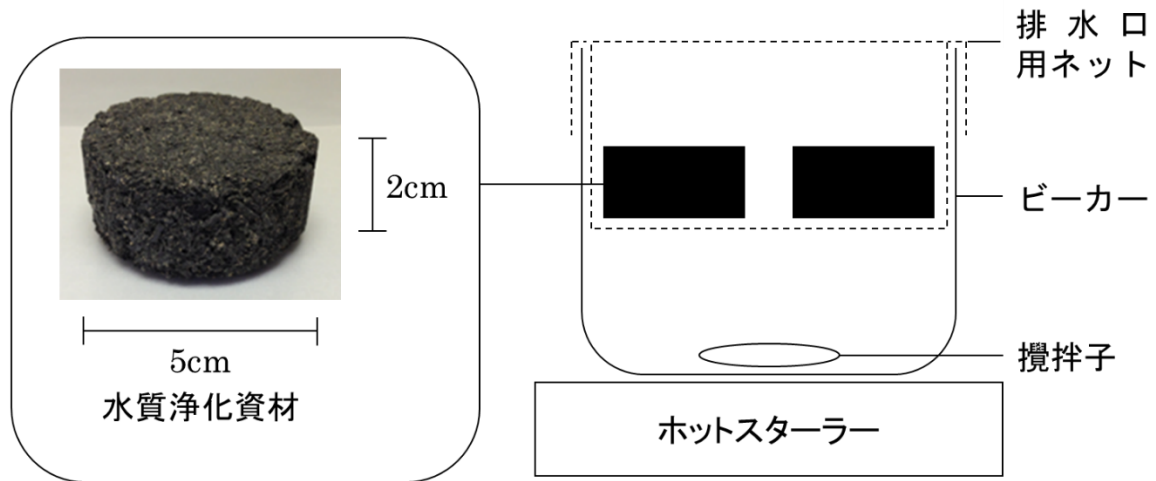


図 2-1 水質浄化資材を組み合わせた排水処理装置

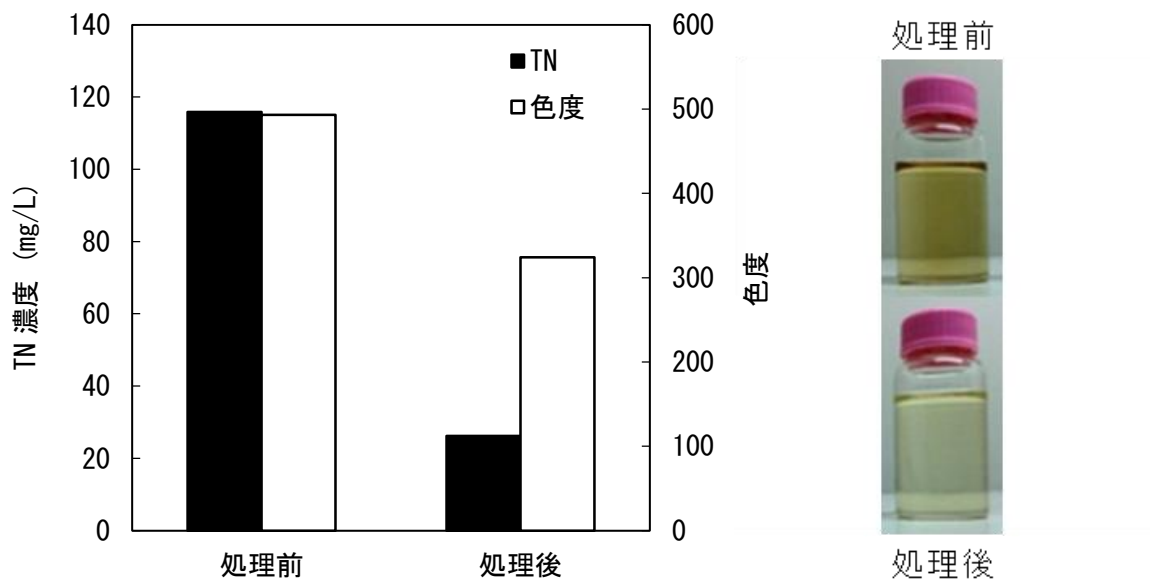


図 2-2 水質浄化資材により処理した畜産 2 次処理排水中の全窒素 (TN), 色度と脱色写真

2-3 合成排水を用いた水質浄化資材の処理評価

2-3-1 実験材料と方法

(1) 合成排水の組成と処理方法

合成排水は、津野らを参考に金属塩と NH_4Cl (NH_4^+ : 100mg/L) で組成された【30】(表 2-1)。この排水 1L を図 2-1 の装置に移し 8 日間処理 (水温 35°C、400rpm) した。

(2) 水質浄化資材により処理した合成排水中の成分分析

2-3-1 の (1) で 2 日毎に処理した排水 10ml をプラスチックホルダーとメンブレンフィルター (細孔径 : 0.45 μm) で濾過後、水質基準に関する省令の規定に基づき NH_4^+ と NO_2^- 、 NO_3^- 、TOC、酸化還元電位 (ORP) を測定した。

NH_4^+ はナトリウムフェノキシド (NaOH : 35g/L、Phenol : 125g/L、Aceton : 24g/L) と 10% 次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いたインドフェノール法により、 NH_4^+ 濃度 0.5mg/L から 6.0mg/L 範囲内で希釈した試料を測定した。まず試料 25ml にナトリウムフェノキシド 10ml を加え混合し、10% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 5ml を加え超純水で 50ml にメスアップ後、直ちに転倒混和し室温で 30 分間反応させた。つぎに紫外可視分光光度計 (日本分光社製 : V-530) で波長 630nm の吸光度を測定し、予め作成した検量線と式 (2-1) により試料中の NH_4^+ 濃度および除去率を求めた (図 2-3)。

$$\text{Removal rate of NH}_4^+ (\%) = \frac{\text{NH}_4^+ \text{ initial} [\text{mg/L}] - \text{NH}_4^+ \text{ final} [\text{mg/L}]}{\text{NH}_4^+ \text{ initial} [\text{mg/L}]} \times 100 \quad (2-1)$$

NO_3^- と NO_2^- はイオンクロマトグラフィー (Metrohm 社製 : 930 Compact IC Flex)、TOC は TOC 計 (島津社製 : TOC-L)、ORP は ORP 計 (AS ONE 社製 : ORP-Testr 10) により分析した。

(3) 水質浄化資材によるアンモニウムと硝酸イオン吸着能の評価

硝酸カリウム (KNO_3) 40.3mg を蒸留水 250ml に溶かした水溶液 (NO_3^- : 100mg/L)、また、 KNO_3 40.3mg と塩化アンモニウム (NH_4Cl) 96.8mg の水溶液 (NO_3^- : 100mg/L、 NH_4^+ : 100mg/L) を組成し、各水溶液中に水質浄化資材を投入後、水温 35°C、1 時間で反応させた。反応後、各反応溶液中の NO_3^- と塩化物イオン (Cl^-) をイオンクロマトグラフィー、また、 NH_4^+ をインドフェノール法により測定した。

表 2-1 合成排水の組成

成分名	成分濃度 [mg/L]
NH ₄ Cl	387
K ₂ HPO ₄	33.3
NaHCO ₃	767
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200

pH 8

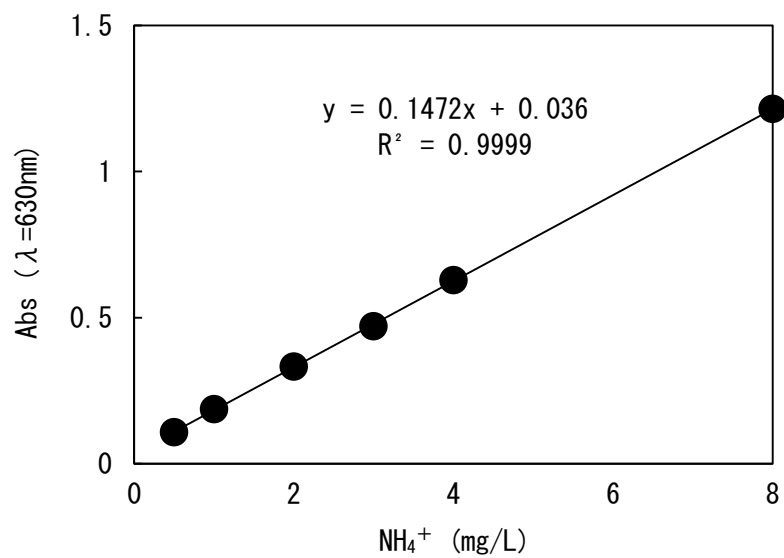


図 2-3 インドフェノール法により作成した 0.5mg/L から 8.0mg/L NH₄⁺の検量線

2-3-2 結果と考察

水質浄化資材により、合成排水中の NH_4^+ が $112 \pm 4 \text{mg/L}$ から $47.5 \pm 4.1 \text{mg/L}$ に減少し、初期 pH 8.02 が処理期間中 pH 8.34 ± 0.26 とほとんど変化しなかったことから、pH 9 以上の塩基性条件下で生じるアンモニアストリッピングによる NH_4^+ 減少の影響はほとんどなく、また、排水中から NO_2^- は検出されず、 NO_3^- が $0.13 \pm 0.05 \text{mg/L}$ 検出された【31】(図 2-4)。TOC は 2 日目以降ほとんど減少せず、ORP は -53.5mV から -70.5mV と嫌気条件下を維持した(図 2-5)。水質浄化資材に担持されている枯草菌の種属には、 NH_4^+ の酸化により NO_2^- と NO_3^- を生成する *B. subtilis* が報告されていることから、本実験で使用した枯草菌により合成排水中の NH_4^+ が NO_2^- および NO_3^- に変換後、水質浄化資材の原料である炭化パレットが NO_2^- と NO_3^- を吸着除去したと考えられた【22】【23】【25】【32】【33】。しかし、水質浄化資材を KNO_3 水溶液 (NO_3^- : 96.6mg/L)、また、 KNO_3 と NH_4Cl 混合水溶液 (NO_3^- : 95.7mg/L 、 NH_4^+ : 127.7mg/L) 中で水温 35°C 、1 時間放置したところ、各水溶液中の NO_3^- および NH_4^+ は減少せず、塩化物イオン (Cl^-) 濃度が KNO_3 水溶液で 85.7mg/L 、 KNO_3 と NH_4Cl 混合水溶液中では 93.6mg/L 増加した。増加した Cl^- は、水質浄化資材中から溶出し、図 2-6 のように竹炭が吸着した NO_2^- や NO_3^- を脱離することから、合成排水中では高濃度の Cl^- が水質浄化資材の吸着機構に影響を与えたと考えられる【23】【25】。よって、合成排水中の NH_4^+ は水質浄化資材に担持された微生物によって減少し、TOC が 2 日目の減少以降ほとんど変化しなかったことから、合成排水中で増殖した好気性微生物の活性が低下し、その後、嫌気性微生物が主に NH_4^+ を減少させたと考えられた【17】【34】。図 2-7 は、合成排水中で形成された生物膜であり、次節では合成排水中で増殖した微生物の単離と同定解析を行った。

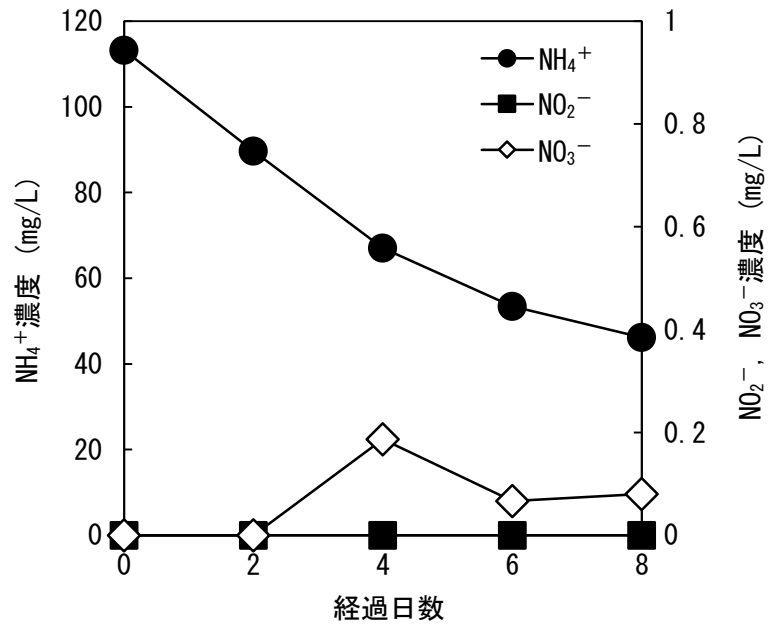


図 2-4 水質浄化資材により 8 日間処理した合成排水中の NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻濃度と pH

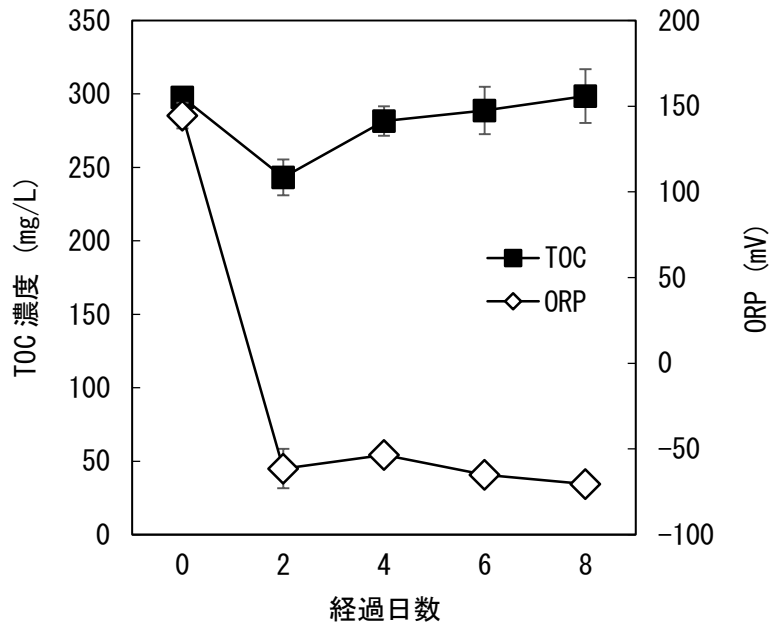


図 2-5 水質浄化資材により 8 日間処理した合成排水中の TOC と ORP

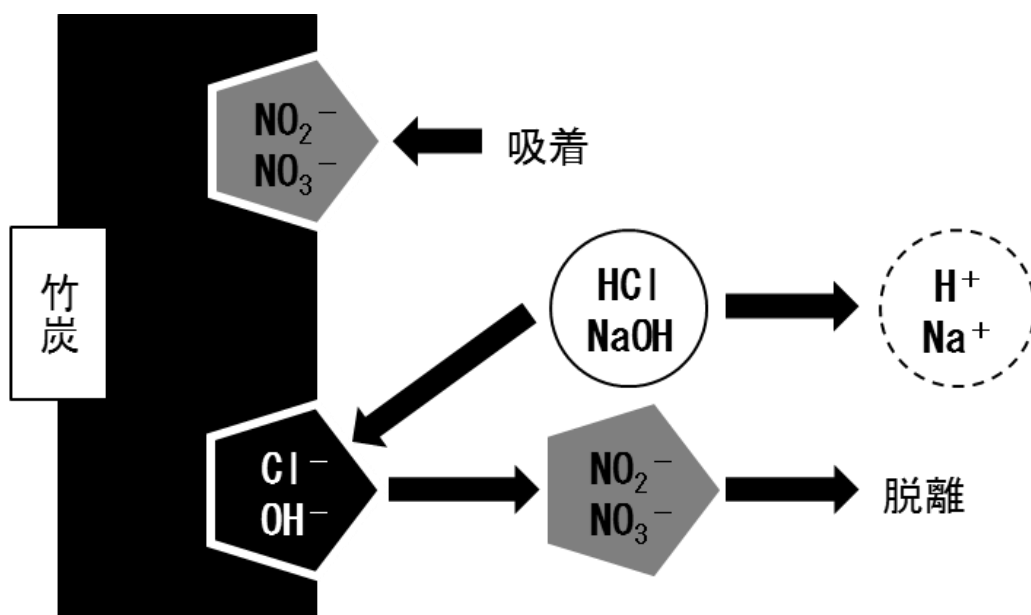


図 2-6 竹炭による水中の NO_2^- および NO_3^- の吸着と脱離



図 2-7 水質浄化資材に形成された生物膜

2-4 水質浄化資材に担持された微生物の解析

2-4-1 実験材料と方法

(1) 合成排水中で増殖した微生物の単離方法

2-3で処理した合成排水の一部を採取し、オートクレーブ（121℃、20分）した0.8%塩化ナトリウム溶液で段階希釈した。この希釈液100μlを合成排水と同様の組成で作製した平板培地上に添加し、コンラージ棒で培地一面に広げ、35℃の恒温器で24時間培養後、微生物コロニーを多数形成させた。この内のシングルコロニーを新しい平板培地上で純粋培養後、ブイヨン平板培地（Beef extract：1g/L、Polypeptone：1g/L、NaCl：0.3g/L、pH 7.0）上で再培養し菌株として保存した。

取得した菌株をブイヨン液体培地で恒温振盪器（35℃、120rpm）により24時間培養した。そして、培養液100μlを表2-2の硫酸アンモニウム含有液体培地（NH₄⁺：30-100mg/L、炭素源：D-グルコース（C₆H₁₂O₆）、無水酢酸ナトリウム（CH₃COONa）が入った三角フラスコに添加し、恒温振盪器（35℃、120rpm）により24時間培養後、培養液中のNH₄⁺をインドフェノール法で測定し、図2-3と式（2-1）により培養液中のNH₄⁺濃度と除去率を求めた【34】。また、NO₂⁻とNO₃⁻をイオンクロマトグラフィー、濁度（OD_{660nm}）を紫外可視分光光度計（波長：660nm）により測定した。

(2) 遺伝子解析技術による分離菌株の同定

2-4-1の(1)で取得した菌株をブイヨン平板培地上で35℃に設定した恒温器により培養し、シングルコロニーを形成させた。このコロニーを滅菌済みの爪楊枝で突き、先端に付着した菌株を滅菌水100μlが入った1.5mlエッペンドルフチューブに洗い落とし、ボルテックスミキサーで5分間振盪後、直接鋳型試料として用いた。この鋳型試料と10pMユニバーサルプライマー（Bact 357F：5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'、937R：5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'）、DNA合成酵素（Promega社製：GoTaq® Master Mix）を用い、ASTECC社製のサーマルサイクラーPC708（PCR条件：94℃ 2min → [94℃ 30sec、52℃ 30sec、72℃ 1min] × 30cycles → 72℃ 10min）により16SrRNA領域の遺伝子断片を増幅させた。増幅させた目的遺伝子断片を1.5%アガロースゲル（1×TAEバッファー（40mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane、20mM Acetic acid、10mM EDTA）、15g/L SEAPLAQUE GTG AGAROSE（FMC社製）、ブロモフェノールブルー（4g/L Bromophenol blue、4g/L Xylene cyanol、500g/L Glycerol）、電気泳動装置（ADVANCE社製：Mupid® -2plus）により電気泳動後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド（10mg/L C₂₁H₂₀BrN₃）で染色し、1×TAEバッファーで脱色した。そして、UV照射機によりDNAバンドの位置を確認しながら、加熱滅菌したメスでアガロースゲルを切取後、1.5mlエッペンドルフチューブに移し-30℃の冷凍庫で2時間以上放置した。2時間後、冷凍庫からエッペンドルフチューブを取り出し、TEバッファー（10mM Tris-HCl buffer、1mM EDTA）200μLを加え、50℃の恒温槽で20分間加温しながら5分毎にエッペンドルフチューブを数回軽く弾いた。そして、エッペンドルフチューブ内のアガロースゲルを取り除き、フェノールクロロホルム（Tris-saturated phenol：

CIA = 1 : 1) を TE バッファーと 1 : 1 になるよう加え、30 分間転倒混和後、10 分間遠心分離（室温、12,000rpm）した。遠心分離後、上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、反応溶液中にアガロースゲルといった不純物を確認したならば、再びフェノールクロロホルムから遠心分離まで行った。そして、採取した上清の 10 分の 1 量の Solution III（3M CH₃COOK、2M CH₃COOH）と 2.5 倍量の 99.5%エタノールを加え数回転倒混和後、-30℃の冷凍庫で 2 時間以上静置させた。2 時間後、エッペンドルフチューブを冷凍庫から慎重に取り出し、10 分間遠心分離（4℃、12,000rpm）後、上清をアスピレーターで取り除いた。そして、70%エタノール 700μl を加え、5 分間遠心分離（4℃、12,000rpm）後、上清を取り除き真空乾燥器で 30 分間乾燥させた。乾燥後、滅菌水 10μl でペレットを溶解し、これを DNA 溶液とした。精製した DNA 溶液と 1.6pmol ユニバーサルプライマー (Bact 157F、937R)、The *BigDye Terminator* v3.1 Cycle Sequencing Kit をサーマルサイクラー（PCR 条件：96℃ 1min→[96℃ 10sec、50℃ 5sec、60℃ 4min]×30cycles→4℃ ∞）により PCR 反応させ、エタノール沈殿後、Hi-Di Formamide (Thermo Fisher SCIENTIFIC 社製) で DNA 溶液を精製した。そして、DNA の塩基配列を ABI PRISM 31 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) で解析後、DDBJ (DNA Date Bank of Japan) により BLAST 検索した。

(3) グラム染色による分離菌株の形態観察

本実験では、Hucker 変法を参考にグラム染色を行った【36】。まず液体培地中で培養した新鮮な菌株を加熱滅菌した白金針でスライドガラス上に薄く広げ、水分を室内で完全に乾燥させた。つぎにメタノール中で 1 分間から 2 分間固定し、室内で完全に乾燥後、クリスタルバイオレット液（関東化学（株）社製）1ml を添加し 1 分間染色した。そして、固定部分以外のスライドガラス上のクリスタルバイオレットを蒸留水で水洗後、ルゴール液（Merck KGaA 社製）1ml を添加し、染色液を菌株の細胞に固定した。スライドガラス表裏に付いているルゴール液を蒸留水で丁寧に水洗後、アルコール混合溶液 (Aceton : Ethanol = 3 : 7) 1ml を添加して直ぐに 2 回から 3 回揺り動かし、早急にアルコール混合溶液を蒸留水で完全に水洗した。そして、サフラニン液（Merck KGaA 社製）1ml で 1 分間染色後、蒸留水で水洗し、キムワイプで余分な水分を取り除いた。最後に油浸オイル (OLYMPUS 社製 : IMMOIL-8CC) と蛍光顕微鏡 (Nikon 社製 : ECLIPSE E600) により染色された菌株の細胞を観察した。

2-4-2 結果と考察

図2-7の処理排水の一部を平板培地上で培養したところ、黄白色と黄色の円形から不規則な形状のコロニーが多数形成され、各菌株を硫酸アンモニウム含有液体培地 (NH_4^+ : 30mg/L) 中で培養し、各菌株の NH_4^+ 除去率を測定した結果、黄白色の YW_株は 11.3%から 39.5%、黄色の Y_株は 83.8%から 96.5% NH_4^+ を除去し、各菌株でコロニーの形状と色が異なる YW_2、YW_9、Y_9 の 16SrRNA 領域の遺伝子断片を増幅させたところ、それぞれ 474bp、552bp、516bp の 16SrRNA 領域の遺伝子断片を取得した (表2-3)。これらの塩基配列を DDBJ により BLAST 検索した結果、YW_2 は *Lysinbacillus fusiformis* strain P103 (99%)、YW_9 は *Brevibacillus agri* strain ST11、Y_9 は *Cronobacter sakazakii* strain BDCSS041 と 99%の相同性を示した (図2-8)。*Lysinbacillus* と *Brevibacillus* は、好気性グラム陽性桿菌類で枯草菌の近縁種に当たることから、これらの菌は予め水質浄化資材に担持されており、好気条件下で合成排水中の NH_4^+ を減少させたと考えられた【37】【38】。*Cronobacter* は、動物の腸管や自然環境下に幅広く分布する通性嫌気性のグラム陰性桿菌であることから、Y_9 をグラム染色したところ、*Cronobacter* と同じグラム陰性を示した【39】【40】(図2-9)。*C. sakazakii* (旧名: *Enterobacter sakazakii*) は、細胞表面の細胞外高分子物質により自身および他の菌の細胞と結合し、高濃度の有機物や窒素含有の排水中で生物膜を形成しながら生息していることから、YW_株と合成排水中で図2-7の生物膜を形成したと考えられる【40】【42】【43】【44】。さらに YW_株と Y_株の中で最も高い NH_4^+ 除去率を示した YW_9 と Y_9 をアンモニウム液体培地 (NH_4^+ : 100mg/L) 中で培養した結果、YW_9 と Y_9 の NH_4^+ 除去率はそれぞれ 7.9%と 54.0%、 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ は 0.023 と 0.313 を示した (図2-10)。また、各菌株の培養液中から NO_2^- および NO_3^- は検出されなかったことから、合成排水中では YW_株と Y_株以外の菌が NH_4^+ から NO_3^- を生成した。枯草菌には、 NH_4^+ を NO_2^- および NO_3^- に酸化するアンモニア酸化菌の存在が確認されており、本実験で使用した水質浄化資材にもアンモニア酸化菌の存在が考えられる【22】【32】。しかし、 NH_4^+ 酸化時に微生物は酸素を必要とし、図2-7の合成排水中は嫌気条件下であったことから、合成排水中の NH_4^+ を優先的に除去したのは通性嫌気性桿菌の *Cronobacter* と高い相同性を示した Y_株であることが考えられた。微生物の窒素代謝には、硝化脱窒作用と窒素同化作用が挙げられ、この内の窒素同化作用は NH_4^+ と NO_3^- を図2-11の経路でアミノ酸から単細胞タンパク (SCP) の合成材料とし細胞を構成する。また、硝化脱窒作用の硝化のように NO_2^- と NO_3^- を発生させず、環境中の NH_4^+ を除去することから、YW_9 と Y_9 は培地中の NH_4^+ を吸収し細胞構成に利用したと考えられた【45】【46】【47】。枯草菌の窒素代謝機構は酵素から遺伝子レベルまで明らかにされており、堆肥中の窒素と有機物の低減化に利用されている【32】【45】【47】【48】。よって、本菌株の中で最も高い NH_4^+ 代謝能を示した *Cronobacter* を用い、メタン発酵処理したパーラー排水中の窒素および有機物処理を検討した。パーラー排水とは、搾乳場やそのパイプラインから発生する搾乳関連排水であり、メタン発酵処理により排水中の脂質、タンパク質、炭水化物を加水分解、酸生成、メタン発酵の順に処理している (図2-12)【29】【49】。そのため、処理排水 (消化液) 中には窒素 (NH_4^+) 以外に糖類と中間生成物の有機酸が残渣として含まれていることから、次節から *Cronobacter* による消化液中の窒素および中間生成物の処理を想定し試験した。

表 2-2 硫酸アンモニウム含有培地の組成 (NH_4^+ : 30–100mg/L)

成分名	濃度 [mg/L]
K_2HPO_4	200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100–400
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	500
CH_3COONa	500

pH 7

表 2-3 合成排水中から単離された菌株のコロニー形態と NH_4^+ 除去率

菌株名, 番号	コロニー形態 [色調, 形状]	NH_4^+ 除去率 [%]
YW_1-8	黄白色, 円形	11.3–28.4
YW_9	黄白色, 不規則形	39.5
Y_1-9	黄色, 円形	83.8–96.5

> YW_2 : 474bp (*Lysinbacillus fusiformis* strain P103)

3' - AGCACTCATCGTTTACGGCAGGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGGCTCCCCACGCTT
TCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAAAT
CTCTACGCATTTACCGCTACACTTGGAATTCACCTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCCCCCA
GTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGGACCGCCT
GCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTG
CTGGCACGTAAGTTAGCCGTGGCTTTCTAATAAGGTACCGTCAAGGTACAGCCAGTTACTAC
TGTACTTGTTCCTTCCCTTACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGC
GTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCTACTGC - 5'

> YW_9 : 552bp (*Brevibacillus agri* strain ST11)

3' - CTCTTGCGGCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTATTGCGTTAGCTGCGGCACTGAGGGTATT
GAAACCCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG
TTTGGTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGCCGCCTTCGCCAC
TGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATACCGCTTTCCTCTTCT
GCACTCAAGCTACACAGTTTCCGATGCGAACCAGGGGTTGAGCCCCGGGCTTTAACACCAGA
CTTACATAGCCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTAC
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAAGTTAGCCGTGGCTTTCCTCGTCAGGTACCGTCAAGGT
ACCGCCCTATTCGAACGGTACGTGTTTCGTCCCTGACAACAGAACTTTACAATCCGAAGACC
TTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGAAAATTCCTACTGCT
G - 5'

> Y_9 : 516bp (*Cronobacter sakazakii* strain BDCSS041)

3' - CGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGC
GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTC
TTCGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCT
ACACCTGGAATTTCTACCCCCCTCTACGAGACTCAAGCTGACCAGTTTCAAATGCAGTTCCC
AGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCTGACTTAATCAACCGCCTGCGTGCCTTTACGCCCA
GTAATTCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCG
GTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGCTGTGGTTATTAACCACAACGCCTTCTCCCCG
CTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTT
GCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTG - 5'

図 2-8 YW_2, YW_9, Y_9 の 16SrRNA 遺伝子断片の塩基配列



図 2-9 Y_9 をグラム染色した顕微鏡写真 (倍率 : ×1,000)

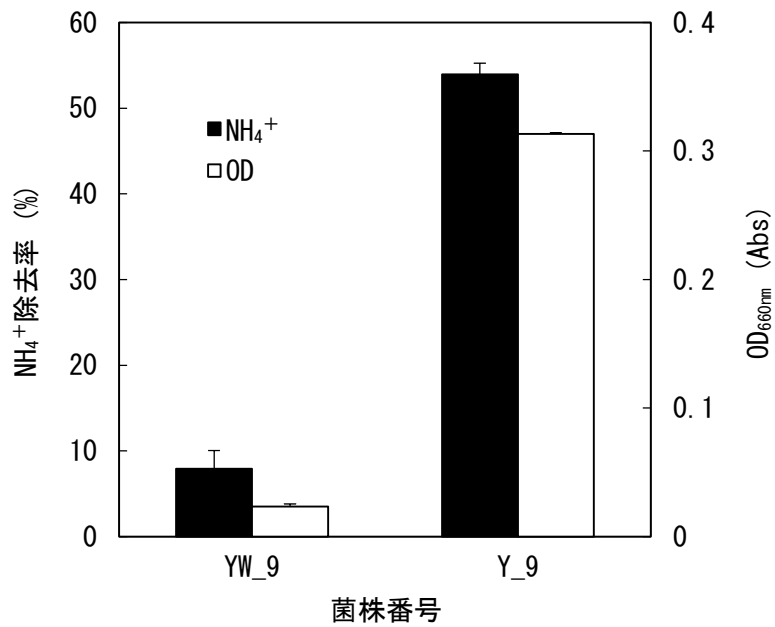


図 2-10 YW_9 と Y_9 の NH₄⁺除去率と OD_{660nm} の比較

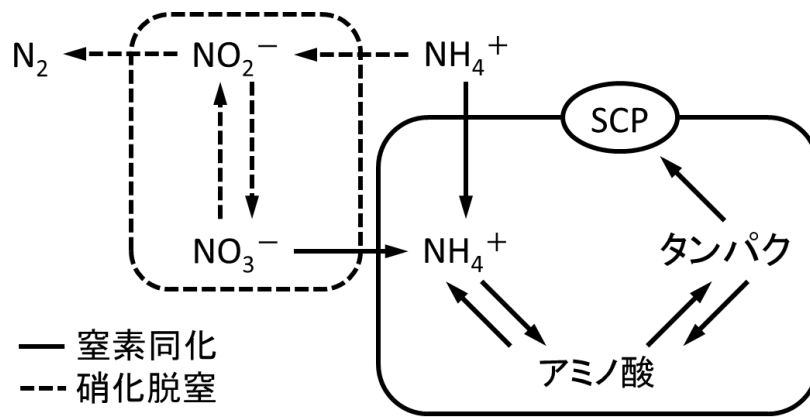


図 2-11 微生物の窒素代謝（窒素同化，硝化脱窒）の模式図

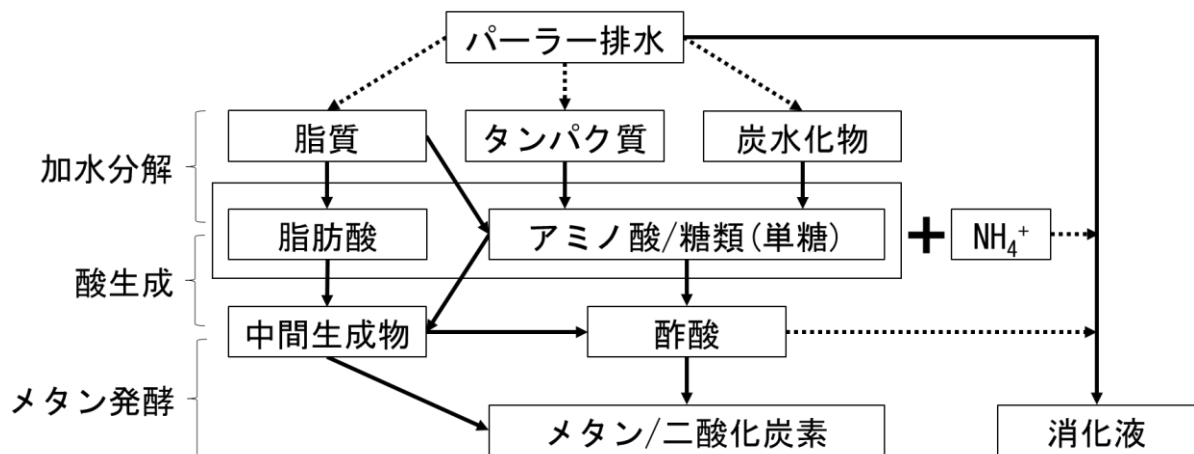


図 2-12 パーラー排水のメタン発酵処理における物質変換の概要

2-5 *Cronobacter* の窒素処理能の評価

2-5-1 実験材料と方法

(1) *Cronobacter* の増殖曲線および検量線の作成

Cronobacter の保存菌株を加熱滅菌した白金針に付着後、ブイヨン平板培地 (Beef extract : 1g/L、Polypeptone : 1g/L、NaCl : 0.3g/L、pH 7.0) にストリークし、35°Cに設定した恒温器で 24 時間培養した。そして、ブイヨン平板培地上に形成されたシングルコロニーを 5ml ブイヨン液体培地が入った試験管内で 35°Cに設定した恒温振盪器 (120rpm) により 24 時間振盪培養した。この培養液 1ml をブイヨン液体培地 250ml が入った 500ml 三角フラスコに添加し、35°Cの恒温振盪器 (120rpm) で培養しながら、3 時間毎に三角フラスコ中の培養液の一部をクリーンベンチ内で採取した。そして、採取した培養液を波長 660nm の紫外可視分光光度計により測定、また、滅菌した 0.8%塩化ナトリウム溶液で段階希釈した。この希釈液 100 μ l をブイヨン平板培地上に添加後、コンラージ棒で培地一面に広げ、35°Cの恒温器で 24 時間培養し、形成されたコロニー数から生菌数 (CFU : CFU/ml) を求めた。

(2) *Cronobacter* の培養と液中の成分分析方法

Cronobacter の保存菌株をブイヨン平板培地からブイヨン液体培地 5ml が入った試験管内で 35°Cの恒温振盪器 (120rpm) により 24 時間培養した。この培養液 100 μ l を硫酸アンモニウム液体培地 (K₂HPO₄ : 200mg/L、MgSO₄ · 7H₂O : 50mg/L、CaCl₂ · 2H₂O : 20mg/L、FeSO₄ · 7H₂O : 1mg/L、(NH₄)₂SO₄ : 400mg/L、炭素源 : 1g/L から 10g/L、pH : 7) および硝酸カリウム液体培地 (K₂HPO₄ : 200mg/L、MgSO₄ · 7H₂O : 50mg/L、CaCl₂ · 2H₂O : 20mg/L、FeSO₄ · 7H₂O : 1mg/L、KNO₃ : 161mg/L、炭素源 : 1g/L から 10g/L、pH : 7) が入った三角フラスコに添加し、恒温振盪器 (35°C、120rpm) により 24 時間培養した。炭素源は糖類 (D-グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、マルトース、スクロース) および有機酸・有機酸塩 (クエン酸、コハク酸、酢酸、乳酸、リンゴ酸、酢酸ナトリウム) を使用した。そして、培養液をプラスチックホルダーとメンブレンフィルター (細孔径 : 0.45 μ m) で濾過後、濾液中の NH₄⁺をインドフェノール法、また、NO₃⁻と NO₂⁻はイオンクロマトグラフィーにより測定した。

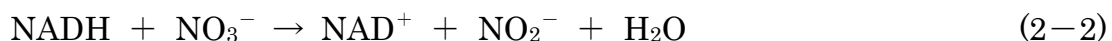
2-5-2 結果と考察

(1) 世代時間毎の *Cronobacter* の生菌数

Cronobacter をブイヨン液体培地で 21 時間培養し、その時の OD_{660nm} を測定したところ、3 時間後に対数期、9 時間後には定常期を迎え、また、9 時間までの OD 値と平板培地上に形成されたコロニー数から検量線を作成した (図 2-13)。つぎに硫酸アンモニウムおよび硝酸カリウム液体培地で *Cronobacter* を培養後、*Cronobacter* の CFU および OD_{660nm} を図 2-13 の検量線により求めた。

(2) 糖類および有機酸培地中での *Cronobacter* による窒素処理

まず *Cronobacter* を各糖類 1g/L (D-グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、マルトース、スクロース) が入った硫酸アンモニウム液体培地 (NH₄⁺: 103±12mg/L) で培養したところ、D-グルコース使用時の NH₄⁺減少量 (25.1mg/L) が最も高く、つぎにガラクトース (23.1mg/L)、キシロース (18.6mg/L)、スクロース (16.8mg/L)、フルクトース (14.0mg/L)、マルトース (13.4mg/L) の順に高い減少量を示し、また、CFU は全て 43×10⁷ CFU/ml 以上の増殖対数期から定常期の値を示した (図 2-14)。つぎに各有機酸 (クエン酸、コハク酸、酢酸、乳酸、リンゴ酸) が入った液体培地 (NH₄⁺: 103±15mg/L) で培養した結果、糖類使用時に比べ全有機酸で高い NH₄⁺減少量 (44±11mg/L)、また、CFU はコハク酸 (82×10⁷ CFU/ml) と酢酸 (77×10⁷ CFU/ml) 以外で糖類と同様の値を示した (図 2-15)。原核生物から真核生物の微生物が有機酸および有機酸塩を吸収時、窒素同化に関わる酵素が活性化し高い細胞増殖能を示すことから、本菌株の *Cronobacter* は有機酸中コハク酸と酢酸存在下での窒素代謝能が優れていると考えられた【50】【51】【52】【53】。特に酢酸は図 2-12 のメタン発酵処理後、消化液中に残留している可能性が高いことから、さらに *Cronobacter* を酢酸塩 (酢酸ナトリウム) 存在下で培養したところ、培養液中の NH₄⁺減少量は 31.9mg/L、CFU は 5.6×10⁸ CFU/ml の糖類使用時に比べ高い値を示した (図 2-16)【49】。*Cronobacter* を D-グルコースおよび酢酸ナトリウムが入った硝酸カリウム液体培地 (NO₃⁻: 106±22mg/L) で培養時、培地中の NO₃⁻が減少、また、D-グルコース使用時には培養液中から NO₂⁻ (1.86mg/L) が検出され、CFU (D-グルコース: 6.3×10⁷ CFU/ml、酢酸ナトリウム: 8.3×10⁶ CFU/ml) は硫酸アンモニウム液体培地での培養時に比べ低く、増殖曲線の誘導期 (CFU: 5.0×10⁷ CFU/ml) 付近を示した (図 2-17)。*Cronobacter* は、NO₃⁻を NO₂⁻に還元する硝酸還元酵素の遺伝子を保持し、近縁種の *Enterobacter* は漬物発酵槽内の NO₃⁻と D-グルコースから NO₂⁻を生成・蓄積し、乳酸発酵を阻害することで知られていることから、本菌株の *Cronobacter* も硝酸還元酵素を保持しており、NO₃⁻と D-グルコースの存在時に NO₂⁻を生成したと考えられた【54】【55】【56】。また、式 (2-2) により硝酸還元酵素 (NADH) と 12.1mg/L NO₃⁻から生成される NO₂⁻は約 9.0mg/L と推定され、本実験で検出された NO₂⁻ (1.86mg/L) が推定値よりも低かったことから、*Cronobacter* は図 2-11 の窒素代謝により NO₂⁻を細胞構成に利用したと考えられた【45】【47】【57】。



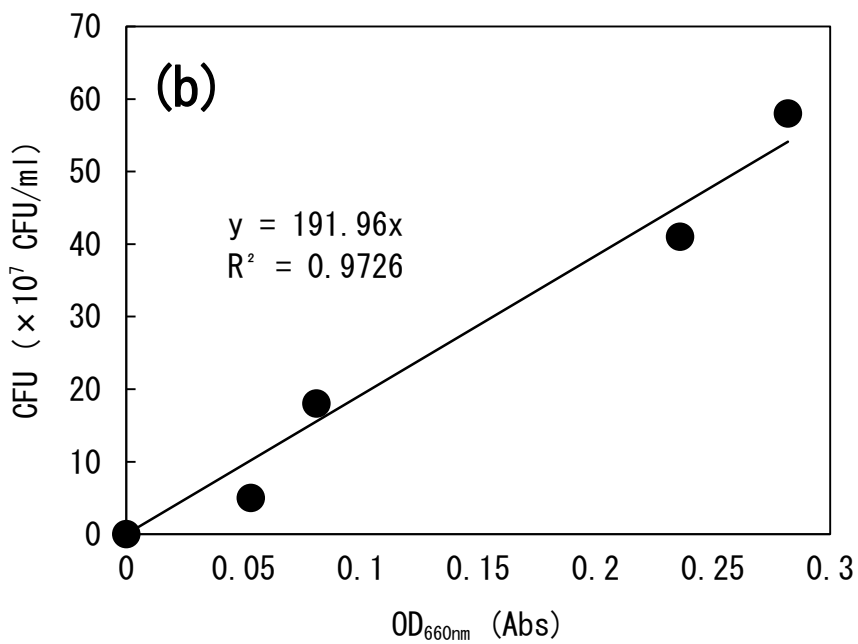
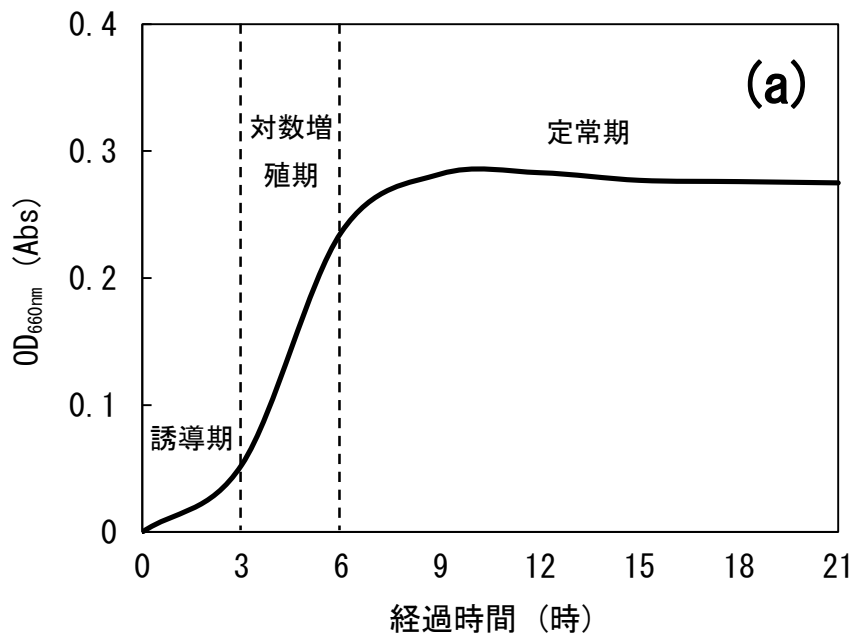


図 2-13 *Cronobacter* の 21 時間の増殖曲線(a), 増殖対数から定常期の CFU と OD_{660nm} の検量線(b)

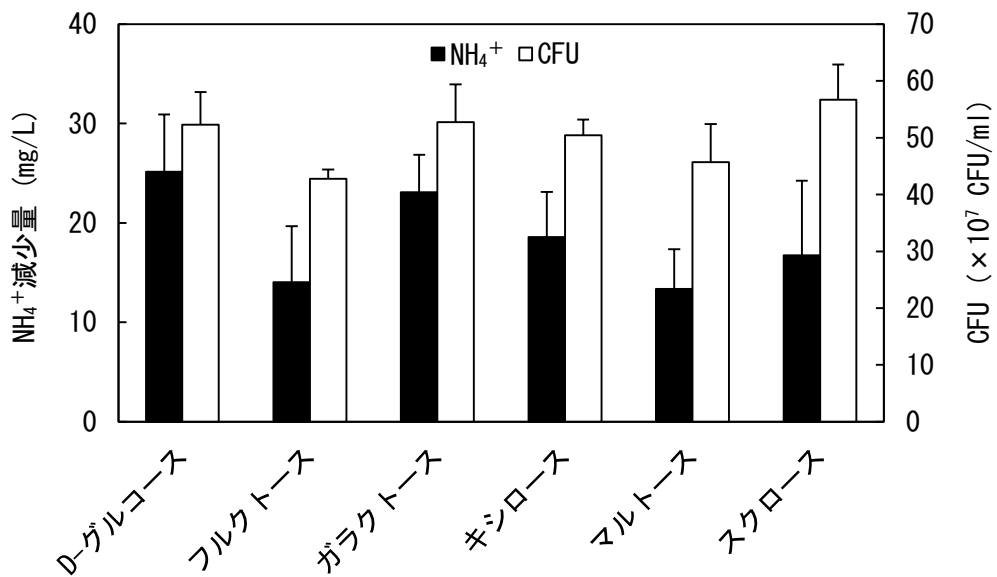


図 2-14 D-グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、マルトース、スクロース使用時の *Cronobacter* 培養液中の NH₄⁺減少量と CFU

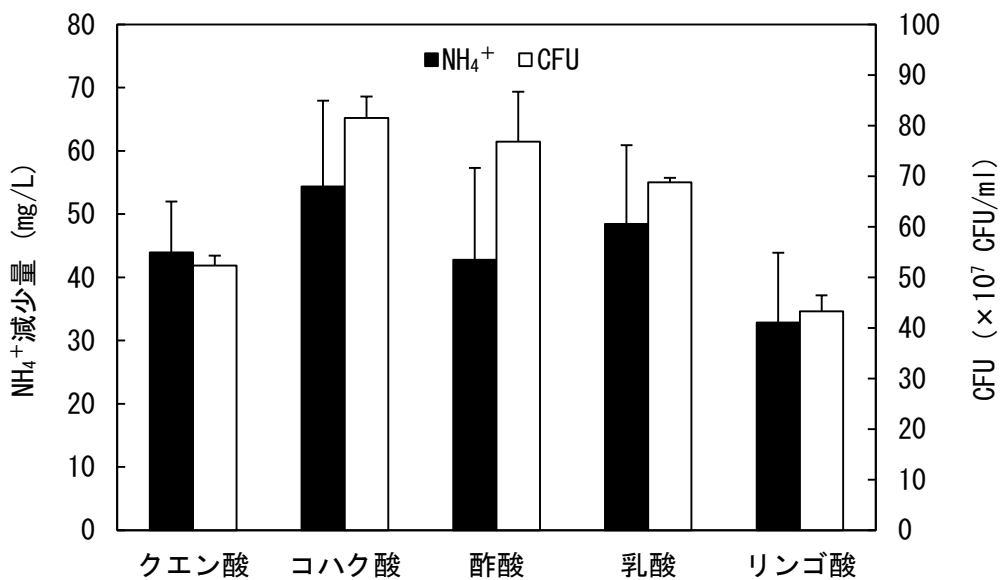


図 2-15 クエン酸、コハク酸、酢酸、乳酸、リンゴ酸使用時の *Cronobacter* 培養液中の NH₄⁺減少量と CFU

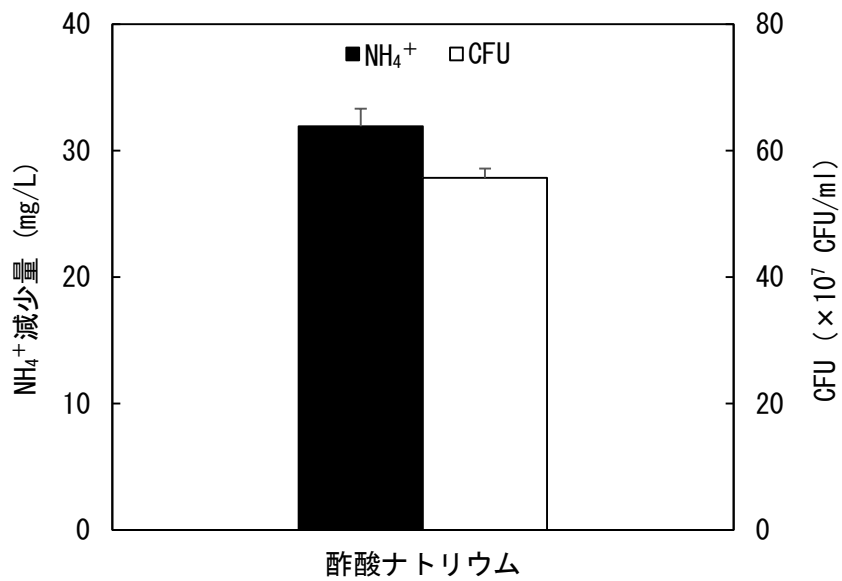


図 2-16 酢酸ナトリウム使用時の *Cronobacter* 培養液中の NH₄⁺減少量と CFU

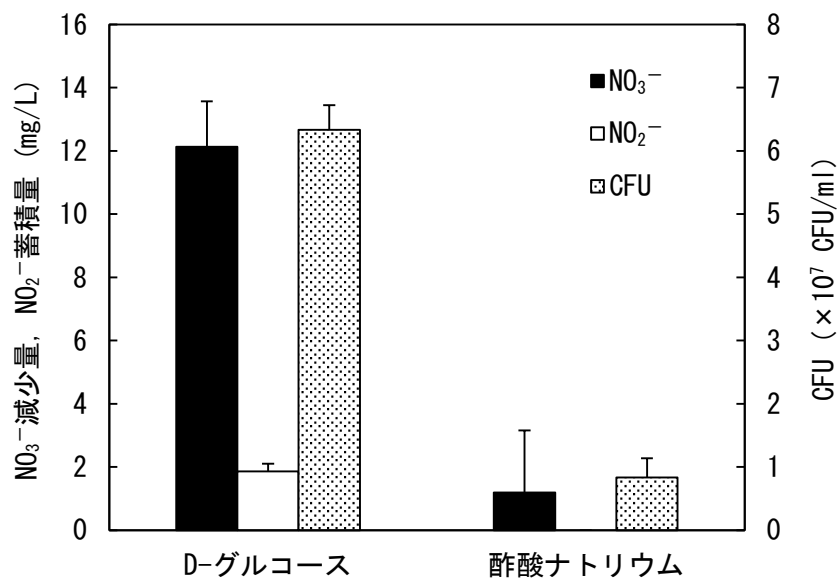


図 2-17 D-グルコースおよび酢酸ナトリウム使用時の *Cronobacter* 培養液中の NO₃⁻減少量, NO₂⁻蓄積量, CFU

2-6 動物性堆肥からの酵母菌の取得

2-6-1 実験材料と方法

(1) 動物性堆肥中の酵母菌の単離と同定方法

動物性堆肥は家畜の糞尿を原料に作られているため、窒素含有量が高く、その条件下で生育する微生物の窒素代謝能が優れていると報告されている【33】【48】【50】。本実験で使用したミミズ堆肥は、植物の生長に必要な窒素やリン酸を豊富に含んでおり、また、無臭で取り扱い易いことで注目されている(図2-18)。この試料から高濃度排水中の有機物および窒素の分解促進に利用される酵母菌の単離を試みた。

図2-18の試料の一部を滅菌済みの0.8%塩化ナトリウム溶液が入った試験管で段階希釈後、各希釈液100 μ Lを抗生物質(2,2-dichloro-N-[1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide)入りの硫酸アンモニウム平板培地(K_2HPO_4 :200mg/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:50mg/L、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$:20mg/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$:1mg/L、 $(NH_4)_2SO_4$:400mg/L、2,2-dichloro-N-[1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide:100mg/L、pH:7)上に添加し、コンラージ棒により培地一面に広げ、35 $^{\circ}$ Cの恒温器で2日から3日間培養した。培養後、平板培地上に形成されたシングルコロニーを加熱滅菌した白金針で突き、抗生物質入りのYPD(Yeast extract:3g/L、Peptone:5g/L、D-glucose:10g/L、Malt extract:0.3g/L、2,2-dichloro-N-[1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide:100mg/L、pH7.3)平板培地上で白金針に付着させた微生物を培養し菌株とした。図2-18の試料から単離した菌株をYPD平板培地から液体培地で24時間振盪培養(35 $^{\circ}$ C、120rpm)後、培養液とスライドガラス、カバーガラスでプレパラートを作製し、蛍光顕微鏡により形態観察した。つぎに遺伝子解析技術による同定では、菌株をYPD平板培地で35 $^{\circ}$ Cの恒温器により培養し、シングルコロニーを形成させた。このコロニーを滅菌済みの爪楊枝で突き、先端に付着した菌株を滅菌水100 μ Lが入った1.5mlエッペンドルフチューブに洗い落とし、ボルテックスミキサーで5分間攪拌後、直接鋳型試料として用いた。この鋳型試料と10pMユニバーサルプライマー(ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACTTGCGG-3'、ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')、DNA合成酵素を用い、サーマルサイクラー(PCR条件:94 $^{\circ}$ C 2min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 30sec、54 $^{\circ}$ C 45sec、72 $^{\circ}$ C 1min) \times 30cycles \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10min)によりITS領域の遺伝子断片を増幅、また、2-4-1の(2)と同様の手法で増幅遺伝子断片の塩基配列解析とBlast検索を行った。

(2) 単離した酵母菌のアンモニウム処理能の評価

2-6-1の(1)の操作により取得した菌株をYPD液体培地から表2-3の硫酸アンモニウム含有の液体培地(NH_4^+ :100mg/L、D-グルコースおよび酢酸ナトリウム:10g/L)で24時間振盪培養(35 $^{\circ}$ C、120rpm)後、培養液をプラスチックホルダーとメンブレンフィルター(細孔径:0.45 μ m)で濾過した。この濾液中の NH_4^+ 、 NO_2^- および NO_3^- 、ODをそれぞれインドフェノール法、イオンクロマトグラフィー(Metrohm社製:930 Compact IC Flex)、紫外可視分光光度計(波長:660nm)により測定した。 NH_4^+ に関しては、図2-3と式(2-1)により培養液中の NH_4^+ 濃度と除去率を求めた。

2-6-2 結果と考察

(1) 単離した酵母菌の形態観察および ITS 領域の塩基配列解析

2-6-1 の操作により、抗生物質入りの YPD 平板培地上には複数の円形状コロニーが観察され、蛍光顕微鏡により観察したところ、酵母菌特有の楕円形の細胞、また、出芽が確認された (図 2-19)。そして、PCR 反応により ITS 領域の遺伝子断片 (459bp) を増幅し、その塩基配列を解析し BLAST 検索した結果、*Candida tropicalis* strain SD7、*C. tropicalis* isolate LMICRO184 と 98% の相同性を示した (図 2-20)。*Candida* は、動物の体内や自然環境に生息する出芽酵母であり、同種属の *Candida albicans* は日和見感染症の原因菌として知られているが、その他は発酵食品の生産、また、本菌株と相同性が高かった *C. tropicalis* は有機物を多量に含む排水処理に利用されている【26】【27】【28】。そして、*Candida* と同じ酵母菌の *Mrakia* 属が活性汚泥法によるパーラー排水中の有機物分解を促進させることから、本菌株の酵母菌も他の微生物との混合培養により NH_4^+ 処理の向上が期待される【29】。

(2) 単離した酵母菌のアンモニウム処理能

2-6-2 の (1) で取得した酵母菌を D-グルコースおよび酢酸ナトリウムが入った硫酸アンモニウム含有液体培地で培養したところ、各炭素源の使用時での NH_4^+ 除去率 (D-グルコース : 52.4%、酢酸ナトリウム : 54.1%) と $\text{OD}_{660\text{nm}}$ (D-グルコース : 1.342、酢酸ナトリウム : 1.241) に大きな差は見受けられなかった (図 2-21)。また、培養後の溶液中からは NO_2^- と NO_3^- は検出されず、硝酸カリウム含有の液体培地での培養時に NO_3^- が除去されなかったことから、本酵母菌は NH_4^+ の代謝に優れていると考えられる【59】【60】。今後、本菌株の酵母菌を *Candida* と記し、また、*Cronobacter* と *Candida* は有機酸存在時に高い NH_4^+ 代謝能を示したことから、有機酸塩の酢酸ナトリウムを炭素源として固定し、各菌を混合培養した。



図 2-18 本実験試料のミミズ堆肥

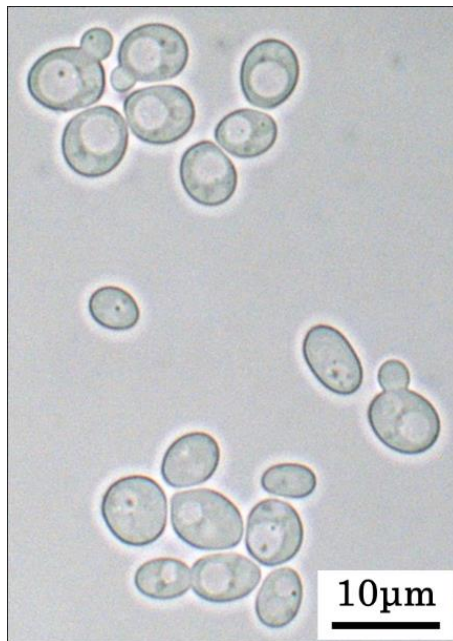


図 2-19 ミミズ堆肥から単離した酵母菌の顕微鏡写真 (倍率 : ×1,000)

>459bp (*Candida tropicalis* strain SD7)

```
3'-TAAATTGTGGTGGCCACTAGCAAATAAGCGTTTTTGGATAAACCTAAGTCGCTTAAAATAAG
TTTCCACGTAAATTCCTTTCAAACAAACCTAGCGTATTGCTCAACACCAAACCCGGGGGTTT
GAGGGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGGTT
ACAAGATTCGATGATTCACGAATATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCT
TCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTGTAATAATAAATCA
AGTTTGACTGTAAATAAAAAGTTTGGTTTAGTTATAACCTCTGGCGGTAGGATTGCTCCCGC
CACCAAAGAAATTTGTTCAATAAAAAAACACATGTGGTGCAATTAAGCAAATCAGTAATGA
TCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAG-5'
```

図 2-20 ミミズ堆肥から単離した酵母菌の ITS 遺伝子断片の塩基配列

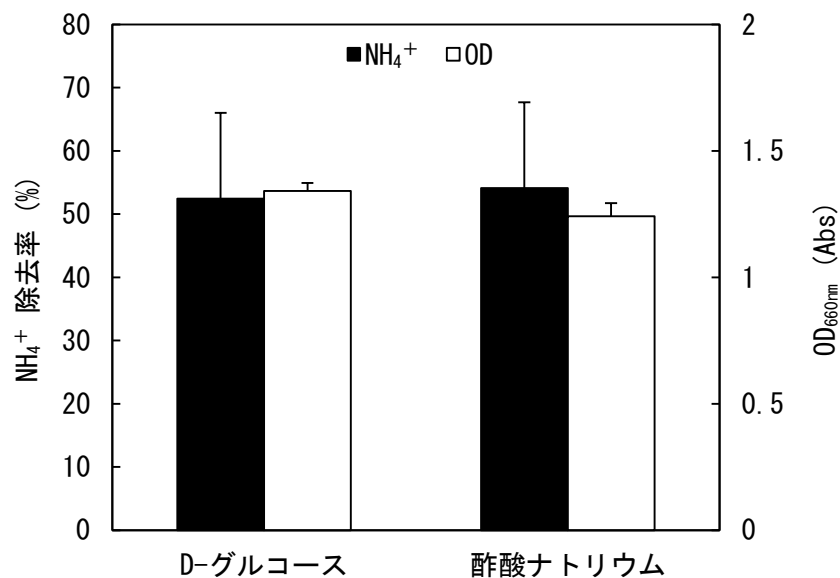


図 2-21 D-グルコースおよび酢酸ナトリウム使用時の *Candida* 培養液中の NH₄⁺除去率と OD_{660nm}

2-7 *Cronobacter* と *Candida* の混合培養によるアンモニウム処理

2-7-1 実験材料と方法

(1) *Cronobacter* と *Candida* の培養方法

Cronobacter および *Candida* の保存菌株をそれぞれブイヨン平板培地と YPD 平板培地上で培養後、各自シングルコロニーを形成させ、各コロニーをブイヨン液体培地および YPD 液体培地 5ml が入った試験管内で 24 時間振盪培養 (35°C、120rpm) した。そして、各培養液 100 μ l を表 3-1 の液体培地 (NH₄⁺:100mg/L、酢酸ナトリウム:1g/L) が入った三角フラスコに添加し 24 時間振盪培養 (35°C、120rpm) した。

(2) 混合培養液中の成分分析と菌の観察

2-7-1 の(1)の操作により *Cronobacter* と *Candida* を純粋培養から混合培養後、培養液をプラスチックホルダーとメンブレンフィルター (細孔径:0.45 μ m) で濾過し、濾液中の NH₄⁺、OD_{660nm}、pH をそれぞれインドフェノール法、紫外可視分光光度計 (波長:660nm)、pH メーターで測定した。また、混合培養液中の *Cronobacter* と *Candida* を蛍光顕微鏡により観察し、培養液の一部を 0.8%塩化ナトリウム溶液で段階希釈した。この希釈液 100 μ l をブイヨン平板培地上に添加後、コンラージ棒により希釈液を培地一面に広げ、35°Cの恒温器で 24 時間培養した。そして、平板培地上に形成された *Cronobacter* のコロニー数から CFU を求め、2-13 の検量線および増殖曲線により混合培養時の *Cronobacter* の細胞増殖量を推定した。

2-7-2 結果と考察

図2-22により、*Cronobacter*と*Candida*を0.1%から1%酢酸ナトリウム液体培地(NH_4^+ :100mg/L)で純粋培養、または混合培養時、*Candida* 純粋培養と混合培養では1%酢酸ナトリウムで NH_4^+ 除去率と $\text{OD}_{660\text{nm}}$ が上昇し、混合培養時に最も高い数値を示した。対して*Cronobacter*を1%酢酸ナトリウムで培養時には、0.1%酢酸ナトリウムに比べ NH_4^+ 除去率と $\text{OD}_{660\text{nm}}$ が低下した。高濃度の有機酸は、*Cronobacter*といったグラム陰性菌に強い抗菌作用を示すことが報告されており、混合培養時にも1%酢酸ナトリウムによる*Cronobacter*への影響が考えられた【61】【62】。よって、混合培養液中の*Cronobacter*と*Candida*を顕微鏡観察したところ、各菌の生育が確認され、また、*Cronobacter*のCFUが純粋培養時の誘導期から対数増殖期への傾向を示していたことから、*Candida*が培養液中の酢酸ナトリウムを一定量減少させたことで、酢酸ナトリウムの抗菌作用が低下したと考えられた(図2-23)。また、培養時のpH変動による NH_4^+ 減少が考えられ、各培養液中のpHを測定した結果、*Cronobacter*純粋培養時のpHはほとんど変動しなかったが、*Candida*純粋培養と混合培養時には初期pHから弱塩基性に変化した。有機酸資化性能が高い酵母を培養した際、培養液中のpH上昇が報告されていることから、本菌株の*Candida*においても同じ現象が培地中で生じたと考えられる【63】【64】。また、塩基性下で生じるアンモニウムストリッピングはpH9以上が適切な条件であることから、今回のpH変動による培地中の NH_4^+ 減少はほとんど影響を受けなかったと考えられた【31】。以上からパーラー排水処理後の消化液を想定した*Cronobacter*および*Candida*による NH_4^+ 処理は、排水中の中間生成物の有機酸を利用しながら、 NH_4^+ を代謝処理することが考えられる。また、従来の活性汚泥法によるパーラー排水処理を*Candida*の酵母反応槽や*Cronobacter*との集積培養法に変換することで、有機物と窒素の分解促進や余剰汚泥の発生を低減化させることが期待される(図2-24)【29】【65】。

2-8 まとめ

枯草菌を担持させた水質浄化資材により畜産2次処理排水の実排水と合成排水中の高濃度の窒素成分(TN:120mg/L、 NH_4^+ :100mg/L)を減少させ、また、合成排水中の NH_4^+ 処理時に NO_2^- が検出されなかったことから、本研究資材はEBB(処理対象の $\text{NH}_4\text{-N}$:約0.5mg/L、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積量:約0.1mg/L)といった従来の水質浄化資材に比べ優れていると考えられた。処理後の合成排水中からは枯草菌と近縁種の*Lysinbacillus*、*Brevibacillus*やグラム陰性桿菌類の*Cronobacter*の存在が遺伝子解析技術と顕微鏡観察により確認され、その内の*Cronobacter*が有機酸存在下で高い NH_4^+ 代謝能を示したことから、パーラー排水処理後の消化液中の窒素処理を検討した。さらに動物性堆肥から単離した酵母菌(*Candida*)と混合培養させ NH_4^+ の分解促進を図ったところ、培地中の100mg/L NH_4^+ を約80%減少させ、実際に消化液中の有機酸を利用しながら、 NH_4^+ を処理することが期待される。

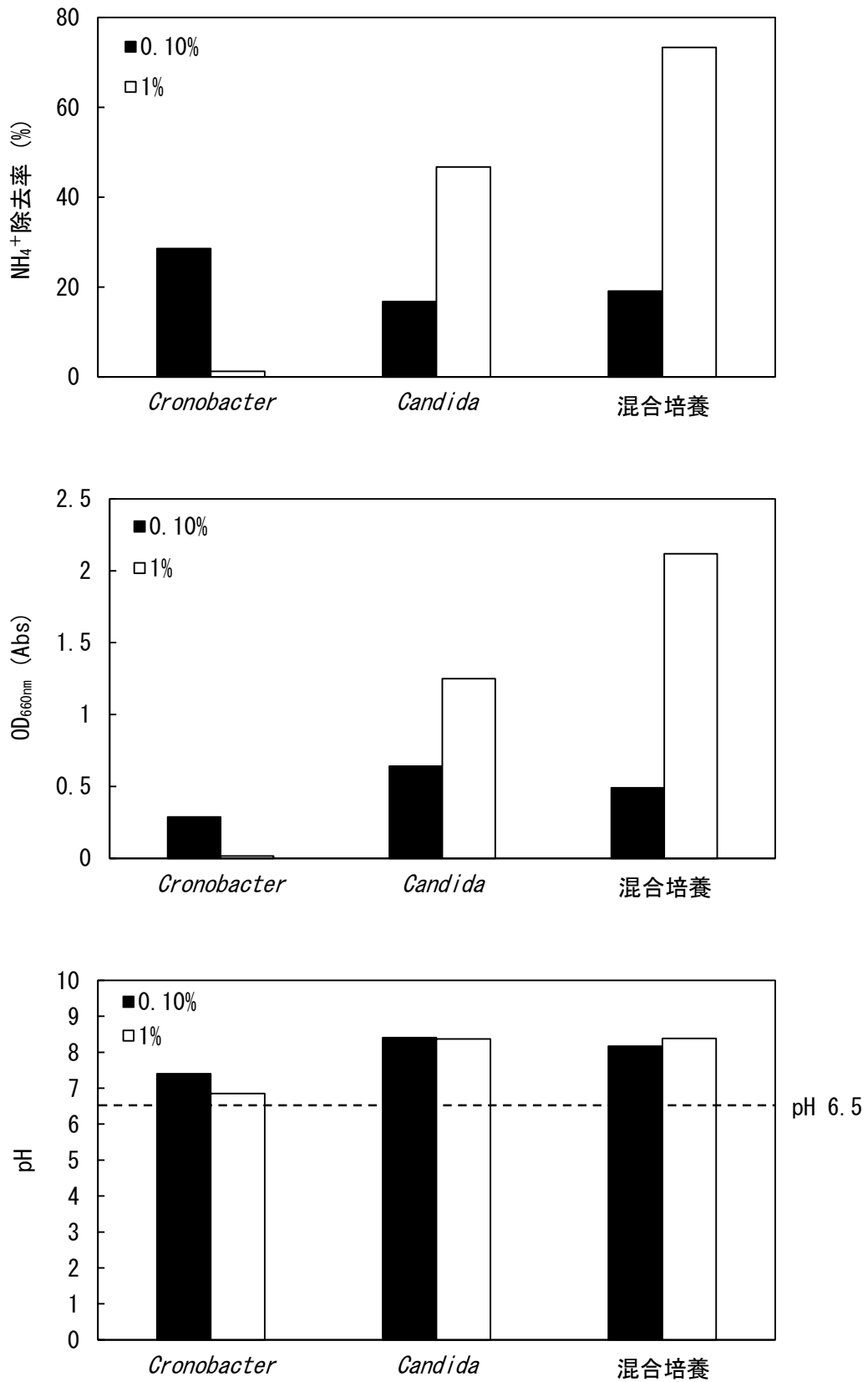


図 2-22 *Cronobacter* と *Candida* の純粋培養および混合培養時の NH₄⁺除去率, OD_{660nm}, pH (初期 pH 6.5)

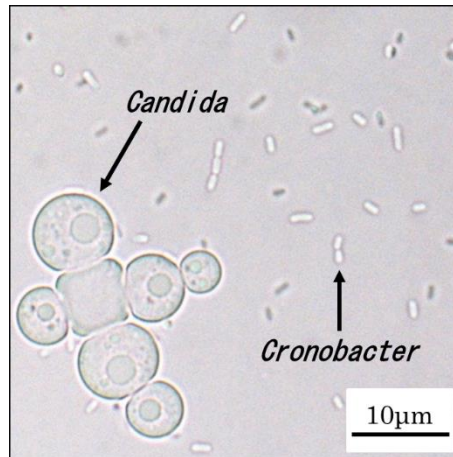


図 2-23 混合培養液中の *Cronobacter* と *Candida* の顕微鏡写真 (倍率 : ×1,000)

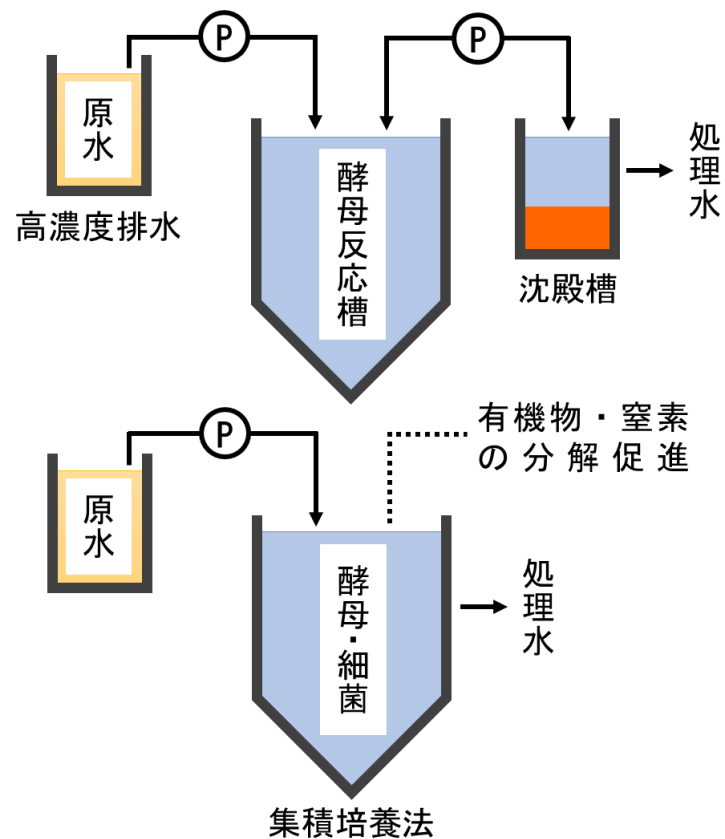


図 2-24 *Candida* (酵母菌) と *Cronobacter* (細菌) を用いた高濃度排水処理システムの構造図

第3章 MPP 晶析法によるリンとカリウムの同時回収

3-1 はじめに

リンの排水基準は、生活環境項目において 50m²以上の豚房、200m²以上の牛房、500m²以上の馬房排水で 1 日当たりの平均排水量 50m³/日以上を規制の対象とし、一般排水基準と暫定排水基準はそれぞれ 16mg/L と 25mg/L に設定されている【4】。年間、畜産業で発生する排水中には約 10 万トンのリンが含まれており、有限な資源のリンを再利用可能な方法で高度処理することが主流となっている【11】【12】。特に晶析法は、金属塩と汚水中のリン酸イオンを結晶化させ、そのまま肥料として再利用できることから、様々な種類の排水処理において利用されている【14】【20】。金属塩には、塩化マグネシウムといったマグネシウム (Mg²⁺) 塩が使用されており、このマグネシウム塩が汚水中のリン酸イオン、アンモニウム (NH₄⁺) と結合し、リン酸マグネシウムアンモニウム (MAP) が生成される【14】【20】。この MAP 法は、高濃度のリン酸イオンと NH₄⁺を含む畜舎污水への使用に適しており、また、農作物の肥料としてそのまま再利用できることから、晶析法の中でも採用実績が多い。しかし、金属塩をすでに多く含む豚舎污水に関しては、高度処理前の 2 次処理で MAP やヒドロキシアパタイト (HAP) が浄化槽で晶析し、設備の配管系の閉塞といったトラブルを引き起こすことから、2 次処理前に晶析装置を設置し処理する【20】【66】。また、2 次処理後の排水中には MAP 生成に必要な NH₄⁺が低濃度で存在しているため、高度処理として使用することが難しい【6】【7】【67】。本章では、晶析法を利用したリンの高度処理を確立するため、従来の晶析法を参考にしたマグネシウム塩添加による畜産 2 次処理排水中のリン酸イオンとカリウムイオン (K⁺) をリン酸マグネシウムカリウム (MPP) として生成し、回収する方法を検討した【68】【69】【70】。

カリウムは、リンと同じく有限な資源の一つであり、これら資源を我が国は肉類、穀物、野菜、飼料といった形で大量に輸入し、使用後は工場、家庭、畜舎から排水として下水道や農業集落排水処理施設に流入している【68】。近年、晶析法の高度化手法で電解による畜産排水中のリンとカリウムの同時回収について報告されているが、使用上の消費電力によるコスト高や選択的にリンとカリウムの晶析が困難といった問題を抱えている【71】。本実験は、従来の晶析法の原理を参考にし、塩化マグネシウム水溶液の添加により模擬畜産排水中のリンとカリウムを MPP として回収するため、晶析における最適な反応条件と共存物質の影響をバッチ試験で評価し、最終的には MPP 大量生成を目的とした連続試験装置の構築により、模擬畜産排水中のリンとカリウムの同時回収を試みた。MAP は、pH8 から pH9 の範囲内で生成しやすく、高濃度の窒素が残留する畜産 2 次処理排水中から MPP を優先的に生成させるためにも、pH 条件の検討は重要と考えられた【14】【20】【70】。そして、畜産 2 次処理排水中には、高濃度の硝酸イオン (NO₃⁻) や硫酸イオン (SO₄⁻)、また、MPP 生成に必要なリンとカリウムが低濃度で存在する場合があることから、これら物質の共存時の MPP 生成への影響を評価した【72】【73】。

3-2 MPP 生成における最適 pH の検討

3-2-1 実験材料と方法

(1) 模擬畜産排水の組成と反応条件

Kangning Xu らを参考に塩化カリウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化アンモニウムで模擬畜産排水 (K^+ : 25.6mM、 $PO_4\text{-P}$: 6.5mM、 NH_4^+ : 5.6 mM) を調整し、1mM 水酸化ナトリウム水溶液を用いて各設定 pH (pH 8、9、10、11、12) になるよう添加した【71】。そして、ホットスターラー (ASONE 社製: RSH-1DN) で攪拌 (500rpm、15°C) しながら、リン酸態リン ($PO_4\text{-P}$) と Mg^{2+} が 1:1 になるよう、模擬畜産排水中に塩化マグネシウム六水和物で調整した 100mM 塩化マグネシウム水溶液を最終濃度 6.5mM になるまで 1 時間添加し続けた。また、1mM 水酸化ナトリウム水溶液の添加により各設定 pH (pH 8、9、10、11、12) を維持しながら MPP 生成後、濾紙 (ADVANTEC 社製: $\phi 150\text{mm}$) で反応溶液と沈殿物を分離し、濾紙に付着した沈殿物は 60°C の送風定温乾燥器 (ADVANTEC 社製: DRS620DA) で 24 時間乾燥、そして、濾液は ADVANTEC 社製のプラスチックホルダー (PP-25) とメンブレンフィルター (細孔径: 0.45 μm) により再度濾過した。

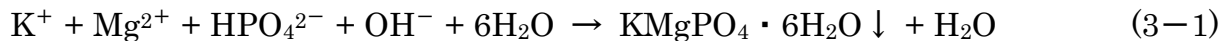
(2) 模擬畜産排水および沈殿物の成分分析・結晶形の観察

3-2-1 の (1) の反応前溶液と濾液中の $PO_4\text{-P}$ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、アンモニウム (NH_4^+) をそれぞれモリブデン青法、原子吸光分析装置 (島津: AA-6300) を用いた原子吸光法と蛍光光度法、インドフェノール法で測定した。モリブデン青法では、関東化学 (株) の特級試薬で調整したモリブデン酸アンモニウム溶液 ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$: 12g/L、 $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$: 0.48g/L、 $2MH_2SO_4$: 320mL) と L-アスコルビン酸溶液 ($C_6H_8O_6$: 72g/L) により、0.4mg/L から 2mg/L $PO_4\text{-P}$ 濃度の範囲内に希釈した試料を測定した。まず 50mL 比色管に試料 50mL とモリブデン酸アンモニウム溶液 2ml を添加し混合後、L-アスコルビン酸溶液 0.5mL を加えて再度混合し、暗室で 10 分間静置させた。つぎに紫外可視分光光度計 (JASCO 社製: V-530) で波長 880nm の吸光度を測定し、予め作成した検量線から試料中の $PO_4\text{-P}$ 濃度を求めた。インドフェノール法においても、関東化学 (株) の特級試薬で組成したナトリウムフェノキシド ($NaOH$: 35g/L、Phenol: 125g/L、Aceton: 24g/L) と 10%次亜塩素酸ナトリウム溶液により、0.5mg/L から 6.0mg/L NH_4^+ 濃度の範囲内に希釈した試料を測定した。まず試料 25ml にナトリウムフェノキシド 10ml を加え混合し、10%次亜塩素酸ナトリウム溶液 5ml を加え超純水で 50ml にメスアップ後、直ちに転倒混和し室温で 30 分間反応させた。つぎに紫外可視分光光度計で波長 630nm の吸光度を測定し、予め作成した検量線から試料中の NH_4^+ 濃度を求めた。沈殿物については分析走査型電子顕微鏡 (JEOL 社製: JSM-6510A) による形状観察と EDS 分析を行い、酸溶解後、反応前溶液および濾液と同様の分析方法によりイオン・元素成分を分析した。

3-2-2 結果と考察

(1) 中性から塩基性下での MPP 生成

まず 3-2-1 の各設定 pH (pH 8、9、10、11、12) で処理した模擬畜産排水中の $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 NH_4^+ 減少量を測定したところ、pH が中性に近づくにつれて各イオン減少量は低下した (表 3-1)。特に pH 8 と pH 9 での K^+ 減少量が最も低かったことから、MPP の溶解度積 ($K_{sp}: 2.4 \times 10^{-11}$) に比べて低い MAP ($K_{sp}: 7.8 \times 10^{-15}$) やリン酸マグネシウム ($K_{sp}: 1.4 \times 10^{-25}$) が優先的に生成されたと考えられた【70】。対して pH 11 では K^+ 減少量が最も高く、 $\text{K}^+ : \text{Mg}^{2+} : \text{PO}_4\text{-P}$ の減少比率がほぼ 1 : 1 : 1 であったことから、pH 11 下で式 (3-1) の MPP ($\text{KMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) が高純度で生成されたと考えられた【71】【74】【75】。



つぎに白色沈殿物中の $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 NH_4^+ 濃度を測定した結果、pH が中性に近づくにつれ K^+ 含有量は低く、また、 NH_4^+ 、 Mg^{2+} 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ がほぼ 1 : 1 : 1 で構成されていた (図 3-1)。pH 8 から pH 9 の中性付近は、MAP 晶析の最適 pH であることから排水中では MAP が優先的に生成され、対してアルカリ性付近の pH 10 では白色沈殿物中の K^+ と NH_4^+ が同程度含まれており、また、pH 11 では K^+ 、 Mg^{2+} 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 含有量がほぼ 1 : 1 : 1 であったことから、MPP が優先的に生成されたと考えられた【14】【20】。そして、pH 11 の強塩基性条件下では式 (3-2) のアンモニアストリッピングにより溶液中の NH_4^+ が 3 分の 1 程度アンモニア (NH_3) として気化したため、MAP の晶析を抑制したと考えられる【31】【76】。

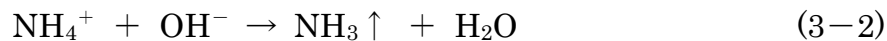


図 3-2 のリン酸イオンの溶解度曲線により、MPP 生成時に必要なリン酸水素イオン (HPO_4^{2-}) が pH 7 から pH 12.5 下で多く存在し、 K^+ 、 Mg^{2+} とのイオン結合時の PO_4^{3-} に移行し易いのが pH 10 から pH 12 であることから、その範囲内の pH 11 では効率的に MPP が生成されたと考えられた【77】【78】。しかし、pH 12 では式 (3-3) のリン酸マグネシウム水和物 ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$) の生成要因となる PO_4^{3-} が多く存在し、また、式 (3-4) の Mg^{2+} と水酸化物イオン (OH^-) の反応による水酸化マグネシウム ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) の生成が白色沈殿物中の MPP 含有量を低下させたと考えられる【77】【78】【79】。以上から高純度の MPP 生成において pH 11 の塩基性条件下が最も適していると考えられた。

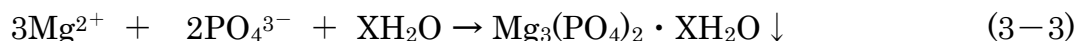


表 3-1 各設定 pH の模擬排水中の PO₄-P, K⁺, Mg²⁺, NH₄⁺減少量

成分 [mM]	pH				
	8	9	10	11	12
PO ₄ -P	4.86	5.33	6.01	6.42	3.58
K ⁺	0.91	1.99	4.35	7.04	2.11
Mg ²⁺	3.23	5.18	5.92	6.44	6.65
NH ₄ ⁺	3.41	3.61	4.15	3.59	3.11

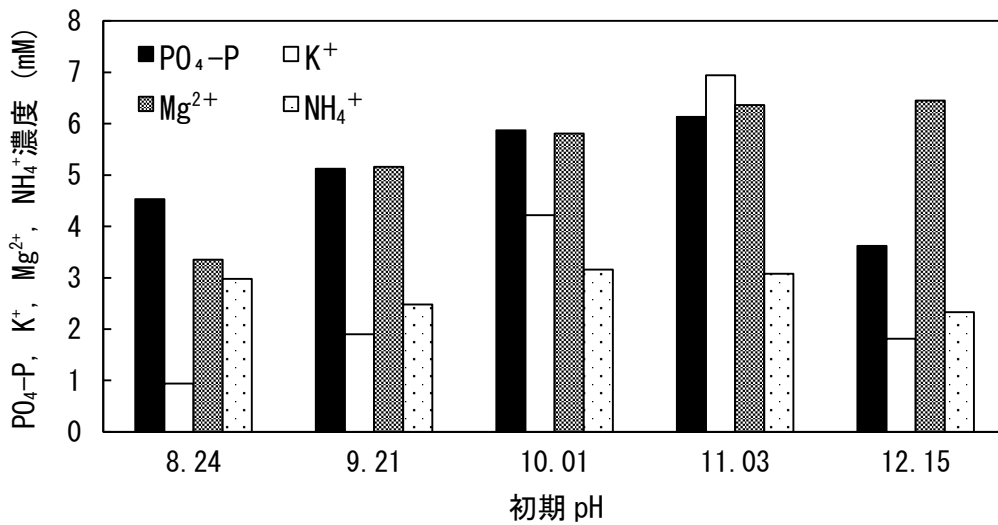


図 3-1 各設定 pH で生成された白色沈殿物中の PO₄-P, K⁺, Mg²⁺, NH₄⁺濃度

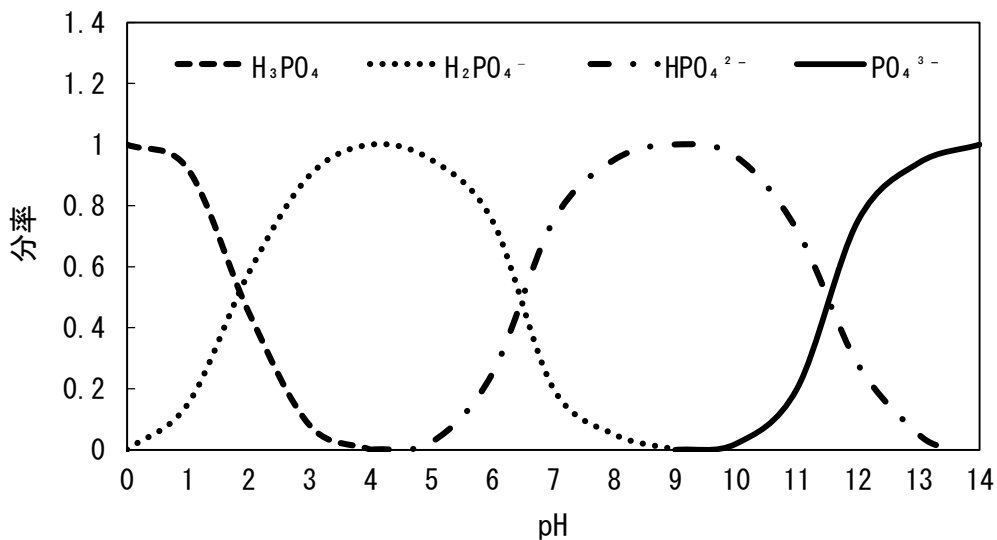


図 3-2 酸性からアルカリ性下でのリン酸イオンの形態と溶解度曲線

(2) 各設定 pH で回収された PO₄-P

表 3-1 と図 3-1 の PO₄-P の数値から、各設定 pH の模擬畜産排水中の PO₄-P 除去率と回収率を式 (3-5) と式 (3-6) により求めた。その結果、pH 11 での PO₄-P 除去率と回収率が最も高く、それぞれ 98.76% と 95.48% であったことから、排水中の PO₄-P のほとんどが白色沈殿物として回収された (表 3-2)。

$$\text{Recovery rate of PO}_4\text{-P} = \frac{\text{PO}_4\text{-P in white precipitate}}{\text{PO}_4\text{-P decrement}} \quad (3-5)$$

$$\text{Removal rate of PO}_4\text{-P} = \frac{\text{PO}_4\text{-P}_{\text{initial}} - \text{PO}_4\text{-P}_{\text{equilibrium}}}{\text{PO}_4\text{-P}_{\text{initial}}} \quad (3-6)$$

各設定 pH の排水中で生成された結晶形を顕微鏡観察したところ、pH 8 では平板状結晶、pH 9 以上では MPP 特有の針状結晶が確認された (図 3-3)。また、EDS 分析により pH が上昇するにつれ結晶中の K 含有率は上昇し、pH 12 では K と P の含有率が低下した (図 3-4)。pH 8 条件下で確認された平板状結晶は、元素構成および質量分析からリン酸一水素マグネシウム (MgHPO₄ · 3H₂O) であることが分かり、また、図 3-2 の pH 8 ではリン酸イオンが主に HPO₄²⁻ の形態で存在していることから、優先的に MgHPO₄ · 3H₂O が生成されたと考えられた。pH 12 では Mg₃(PO₄)₂ · xH₂O の生成要因となる PO₄³⁻ が多く存在し、また、pH 調整時に使用した水酸化ナトリウム水溶液が溶解度積の低い Mg(OH)₂ (K_{sp} : 1.2 × 10⁻¹¹) を生成させたと考えられる【74】【78】【79】。よって、pH 11 の条件下で排水中から除去された PO₄-P の大部分は MPP として回収されたと考えられた。

表 3-2 各設定 pH の模擬畜産排水中の PO₄-P 除去率と回収率

PO ₄ -P	pH				
	8	9	10	11	12
除去率[%]	74.77	82	92.46	98.76	55.07
回収率[%]	93.2	96.06	97.67	95.48	99.68

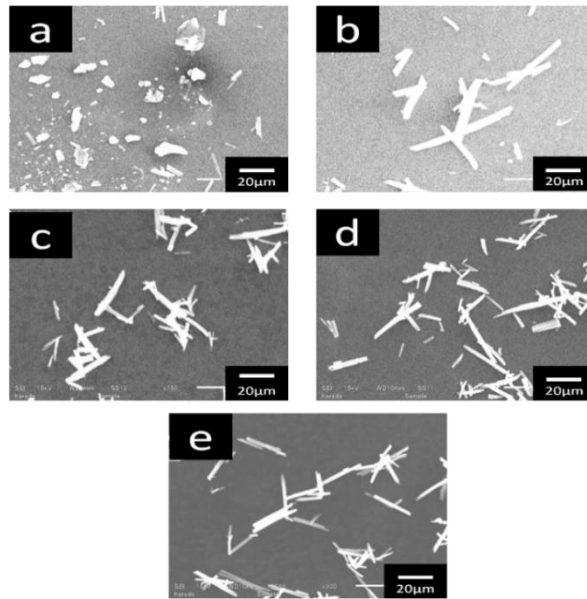


図 3-3 pH 8 (a), pH 9 (b), pH 10 (c), pH 11 (d), pH12 (e) 下で生成された結晶の顕微鏡写真

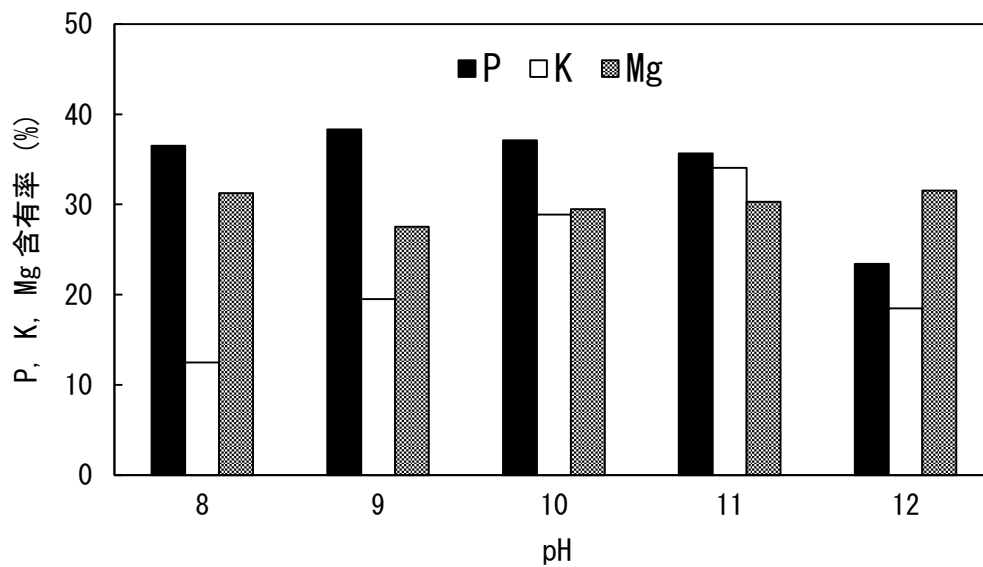


図 3-4 EDS 分析による各設定 pH で生成された結晶中の元素成分の含有率

3-3 強塩基性下での MAP の晶析評価

3-3-1 実験材料と方法

(1) アンモニウム含有排水の組成と反応条件

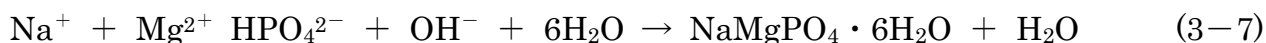
リン酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4) で調整した排水 A ($\text{PO}_4\text{-P}$: 6.5mM)、また、リン酸二水素ナトリウムと塩化アンモニウム (NH_4Cl) で調整した排水 B ($\text{PO}_4\text{-P}$: 6.5 mM、 $\text{NH}_4\text{-N}$: 5.6mM) をホットスターラーで攪拌 (500 rpm、15 °C)しながら、 $\text{PO}_4\text{-P}$ と Mg^{2+} が 1:1 になるよう、排水 A と B 中に 100mM 塩化マグネシウム水溶液を最終濃度 6.5mM になるまで 1 時間添加し続けた。また、1mM 水酸化ナトリウム水溶液の添加により pH 11 を維持しながら反応後、濾紙で反応溶液と沈殿物を分離し、濾紙 ($\phi 150\text{mm}$) に付着した沈殿物は 60°C の送風定温乾燥器で 24 時間乾燥、そして、濾液はプラスチックホルダーとメンブレンフィルター (細孔径: 0.45 μm) により再度濾過した。

(2) アンモニウム含有排水および沈殿物の成分分析・結晶形の観察

3-3-1 の (1) の反応前溶液と濾液中の $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 Mg^{2+} 、 NH_4^+ をそれぞれモリブデン青法、原子吸光分析装置を用いた原子吸光法、インドフェノール法により測定し、沈殿物の結晶形を分析走査型電子顕微鏡により形状観察した。

3-3-2 結果と考察

pH 11 で排水 A と B を処理したところ、各排水中の $\text{PO}_4\text{-P}$ は 2.32mM から 2.45mM、また、 Mg^{2+} は約 3.4mM 減少しており、これは表 3-1 の $\text{PO}_4\text{-P}$ (6.42mM) と Mg^{2+} (6.44mM) 減少量の約 2 分の 1 であった (表 3-5)。排水 B 中の NH_4^+ はほとんど減少せず、pH 11 の塩基性条件下ではリン酸イオンが HPO_4^{2-} と PO_4^{3-} の形態を平衡に成すため、式 (3-7) により各排水中ではリン酸マグネシウムナトリウム ($\text{NaMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) が生成されたと考えられた【80】【81】。



また、排水 A と B 中の結晶形を観察したところ、各排水ともに $\text{NaMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 特有の板状結晶、また、排水 B 中では低濃度の NH_4^+ (0.32mM) により生成された MAP の粒状結晶も確認された (図 3-3)【14】【64】。表 3-5 と図 3-3 により、pH 11 条件下での MAP の晶析による MPP 生成への影響はほとんどないと考えられた。しかし、pH 調整時の水酸化ナトリウム水溶液の添加により、溶液中のナトリウムイオン (Na^+) 濃度が上昇し、 $\text{NaMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 生成の要因になったことから、対策としてエアレーション方式を用いた排水中の pH 上昇を連続試験において試験した【31】【79】【82】。

表 3-5 pH 11 条件下で処理した排水 A と B 中の元素, イオン成分の減少量

PO ₄ -P, Mg ²⁺ , NH ₄ ⁺ 減少量 [mM]	排水 [A, B]	
	A [PO ₄ -P, Mg]	B [PO ₄ -P, Mg, NH ₄ ⁺]
PO ₄ -P	2.32	2.45
Mg	3.40	3.41
NH ₄ ⁺	—	0.32

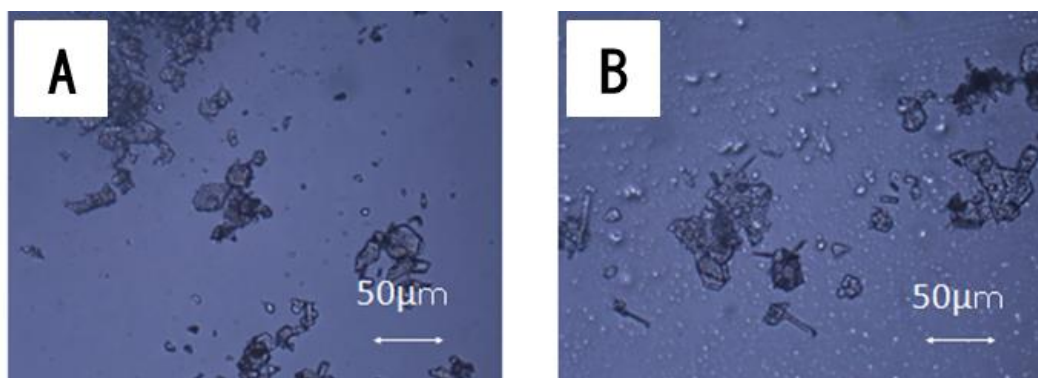


図 3-3 pH 11 条件下で排水 A と B 中に生成された板状結晶 (NaMgPO₄ · 6H₂O) の顕微鏡写真

3-4 硝酸イオンの共存による MPP 生成への影響

3-4-1 実験材料と方法

(1) 硝酸イオン含有排水の組成と反応条件

塩化カリウム、リン酸水素ナトリウム、硝酸 (HNO_3) で各設定濃度の NO_3^- 含有排水 (K^+ : 25.6mM、 $\text{PO}_4\text{-P}$: 6.5mM、 NO_3^- : 0.00、4.02、8.06mM) を調整し、ホットスターラーで攪拌 (500rpm、15°C) しながら、排水中の $\text{PO}_4\text{-P}$ と Mg^{2+} が 1:1 になるように 100mM 塩化マグネシウム水溶液を流速 13ml/h に設定したペリスタポンプ (ATTO 社製: SJ-1211) で 1 時間添加し続けた。また、1M 水酸化ナトリウム水溶液を排水中の pH が pH 11 になるように適宜添加し反応させた。反応後、濾紙 (ϕ 150mm) により反応溶液と沈殿物を分離し、濾紙に付着した沈殿物は 60°C の送風定温乾燥器で 1 時間乾燥、そして、濾液はプラスチックホルダーとメンブレンフィルター (細孔径: 0.45 μm) により再度濾過した。

(2) 硝酸イオン含有排水および沈殿物の成分分析・結晶形の観察

3-4-1 の (1) の反応前溶液と濾液中の $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 NO_3^- をそれぞれモリブデン青法、原子吸光分析装置を用いた原子吸光法と炎光光度法、イオンクロマトグラフィー (Metrohm 社製: 930 Compact IC Flex) で測定した。沈殿物については分析走査型電子顕微鏡による形状観察を行い、酸溶解後には反応前溶液および濾液と同様の分析方法により構成元素・イオンを分析した。

3-4-2 実験結果と考察

表 3-6 により NO_3^- 添加時の $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 減少量は無添加時と比べ大きな差はなく、反応後の 4.02mM と 8.06mM NO_3^- 含有排水中の NO_3^- はそれぞれ 0.28mM、0.09mM と僅かに減少した。そして、各反応溶液中から回収した白色沈殿物中の $\text{PO}_4\text{-P}$: K^+ : Mg^{2+} の構成比は NO_3^- の有無関係なくほぼ 1:1:1 を示し、 NO_3^- はほとんど含まれていなかった (図 3-4)。また、電子顕微鏡により全反応溶液中から MPP 特有の針状結晶が多く確認されたことから、 NO_3^- による MPP 生成への影響はほとんどないと考えられた (図 3-5)。

表 3-6 各 NO_3^- 濃度の排水中における $\text{PO}_4\text{-P}$, K^+ , Mg^{2+} , NO_3^- 減少量

NO_3^- 初期 濃度 [mM]	$\text{PO}_4\text{-P}$, K^+ , Mg^{2+} , NO_3^- 減少量 [mM]			
	$\text{PO}_4\text{-P}$	K^+	Mg^{2+}	NO_3^-
0.00	6.54	7.05	6.43	0.00
4.02	5.53	6.32	6.41	0.28
8.06	5.94	6.17	6.42	0.09

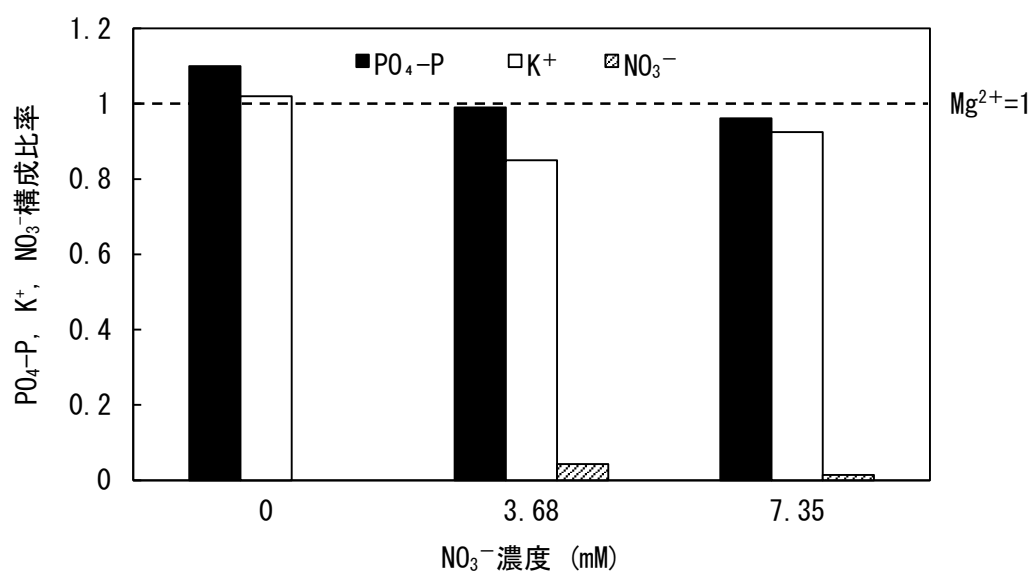


図 3-4 各 NO_3^- 濃度の排水中で生成された白色沈殿物の各イオン構成比 ($\text{Mg}^{2+}=1$)

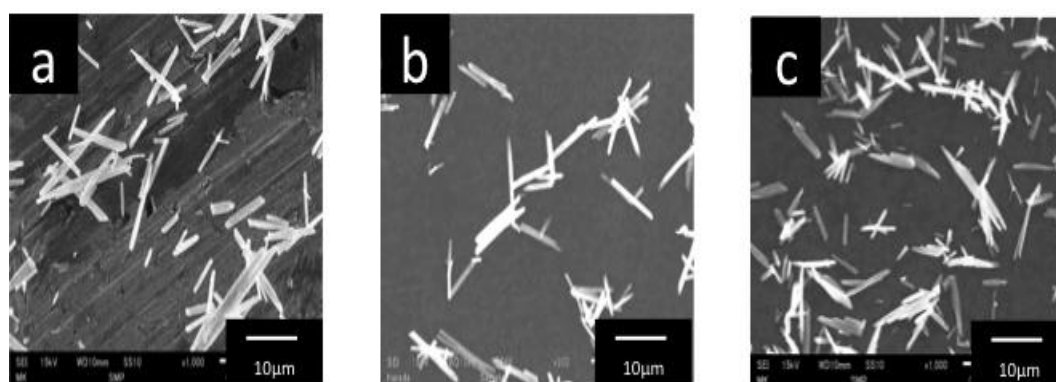


図 3-5 0.00mM (a), 3.68mM (b), 7.35mM (c) NO_3^- 濃度の排水中で生成された MPP の顕微鏡写真

3-5 硫酸イオンの共存による MPP 生成への影響

3-5-1 実験材料と方法

(1) 硫酸イオン含有排水の組成と反応条件

塩化カリウム、リン酸二水素ナトリウム、硫酸アンモニウムを用いて排水 (K^+ : 25.6mM、 $PO_4\text{-P}$: 6.5mM、 SO_4^{2-} : 0.00、1.02、2.04、3.06mM) を調整後、ホットスターラーで攪拌 (500rpm) しながら、排水中の $PO_4\text{-P}$ と Mg^{2+} が 1:1 になるように 100mM 塩化マグネシウム水溶液を流速 13ml/h に設定したペリスタポンプで 1 時間添加し続けた。また、1M 水酸化ナトリウムを排水中の pH が pH 11 になるように適宜添加し反応させた。反応後、濾紙 ($\phi 150\text{mm}$) により反応溶液と沈殿物を分離し、濾紙に付着した沈殿物は 60°C の送風定温乾燥器で 1 時間乾燥、そして、濾液はプラスチックホルダーとメンブレンフィルター (細孔径: 0.45 μm) により再度濾過した。

(2) 硫酸イオン含有排水の成分分析・結晶形の観察

3-5-1 の (1) の反応前溶液と濾液中の $PO_4\text{-P}$ 、 Mg^{2+} 、 K^+ をそれぞれモリブデン青法、原子吸光分析装置を用いた原子吸光法と炎光光度法により測定した。沈殿物については分析走査型電子顕微鏡による形状観察および EDS 分析を行い、酸溶解後には反応前溶液および濾液と同様の分析方法によりイオン・元素成分を分析した。

3-5-2 結果と考察

(1) 硫酸イオン濃度の変化による MPP 生成への影響

表 3-7 により排水中の SO_4^{2-} 濃度が上昇すると同時に K^+ 減少量は低下し、対して SO_4^{2-} 減少量が増加した。これは排水中の Mg^{2+} と SO_4^{2-} が反応し、硫酸マグネシウム ($MgSO_4$) が生成されたことにより、 K^+ 減少量が低下したと考えられた【83】。各反応溶液中で生成された白色沈殿物中の構成成分を分析したところ、 SO_4^{2-} 濃度が上昇すると同時に白色沈殿物中の SO_4^{2-} 含有率が増加し、対して K^+ は減少した (図 3-6)。また、 SO_4^{2-} 存在時の排水中で生成された結晶を顕微鏡観察した結果、低濃度から高濃度の SO_4^{2-} で MPP 特有の針状結晶の粒径が約 50 μm から約 25 μm に縮小したことから、高濃度の SO_4^{2-} は MPP 生成を阻害することが考えられた (図 3-7)。

(2) 硫酸イオン存在下で生成された白色沈殿物の分析

排水中の SO_4^{2-} 初期濃度が 3.06mM 時、生成された白色沈殿物を EDS 分析したところ、 $\text{PO}_4\text{-P}$ (36.0%)、 K (18.4%)、 Mg (45.6%) で構成されており、 SO_4^{2-} 中の硫黄成分のピークはほとんど検出されなかった (図 3-8)。pH 11 では、リン酸イオンが主に HPO_4^{2-} と PO_4^{3-} の形態を取るため、同じ価数の HPO_4^{2-} と SO_4^{2-} が置換固溶し、MPP と同時に溶解度積が高い MgSO_4 や $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ を生成したと考えられた【84】【85】。図 3-6 と図 3-8 の白色沈殿物中の $\text{PO}_4\text{-P} : \text{K}^+ (\text{K}) : \text{Mg}^{2+} (\text{Mg})$ の構成比が 2 : 1 : 2 であったことから、白色沈殿物は MPP や $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ の結晶で構成されており、残りは SO_4^{2-} と Mg^{2+} の反応により生成された硫酸マグネシウムが排水中に溶存していると考えられた。また、硫酸アンモニウムの添加量が増加すると同時に排水中の NH_4^+ 減少量も上昇したことから、強酸性の塩類である硫酸アンモニウム添加直後に pH が低下し、MAP の晶析を引き起こしたと考えられた。しかし、pH 11 下では、アンモニアストリッピングにより MAP の晶析が最小限に抑えられるため、主に SO_4^{2-} が MPP 生成に影響したと考えられた【31】【76】【82】。

表 3-7 各 SO_4^{2-} 濃度の排水中における $\text{PO}_4\text{-P}$, K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} 減少量

SO_4^{2-} 初期 濃度 [mM]	$\text{PO}_4\text{-P}$, K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+ , SO_4^{2-} 減少量 [mM]				
	$\text{PO}_4\text{-P}$	K^+	Mg^{2+}	NH_4^+	SO_4^{2-}
0.000	6.270	6.437	6.316	0.000	0.000
1.020	7.677	5.631	6.305	1.447	0.020
2.040	7.295	5.189	6.398	2.971	0.037
3.060	7.847	2.933	6.278	3.615	0.433

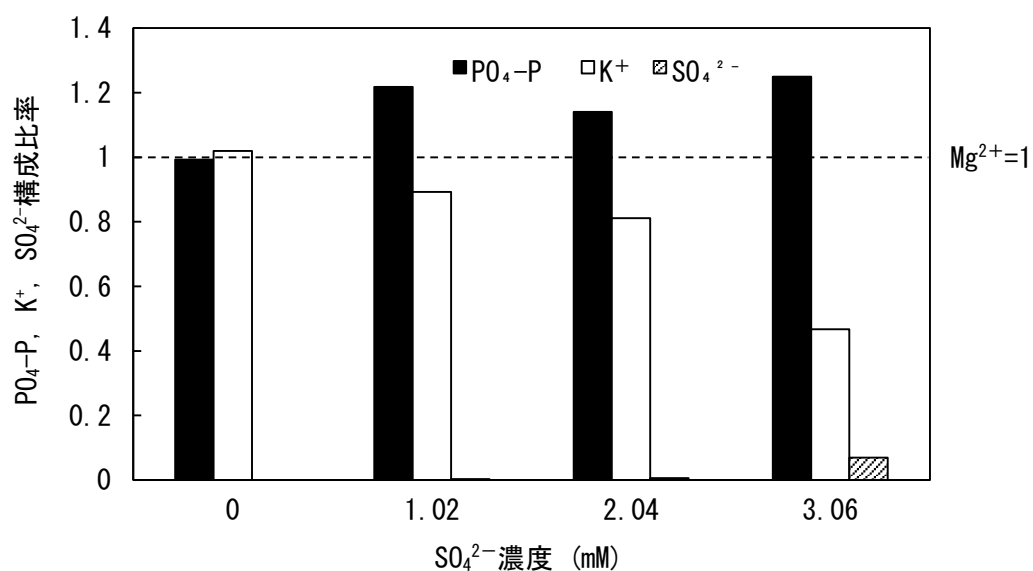


図 3-6 各 SO_4^{2-} 濃度の排水中で生成された白色沈殿物の各イオン構成比 ($\text{Mg}^{2+}=1$)

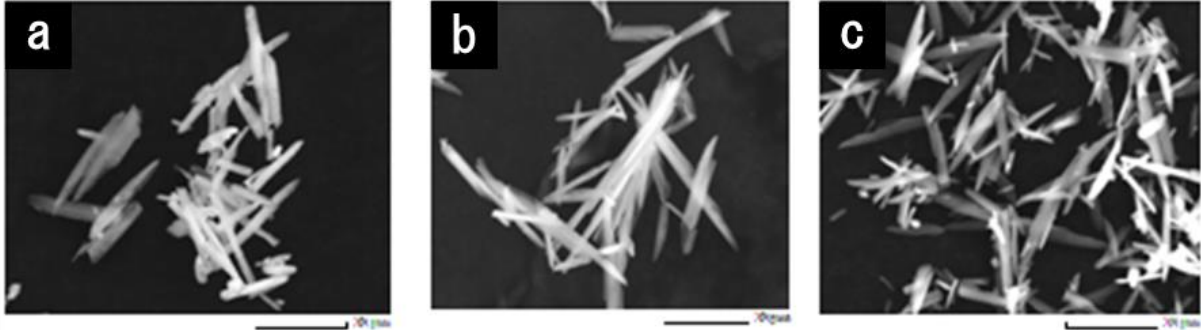


図 3-7 1.02mM (a), 2.04mM (b), 3.06mM (c) SO_4^{2-} 含有排水中で生成された MPP の顕微鏡写真

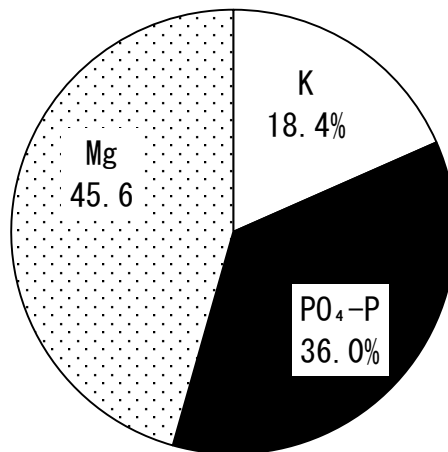


図 3-8 EDS 分析による 3.06mM SO_4^{2-} の排水中で生成された白色沈殿物中の $\text{PO}_4\text{-P}$, K, Mg 構成比率

3-6 低濃度 PO₄-P およびカリウム条件による MPP 生成

3-6-1 実験材料と方法

塩化カリウムとリン酸二水素ナトリウムを用いて低濃度の PO₄-P 排水 (PO₄-P : 0.65、1.61、3.23、4.84mM、K⁺ : 25.6mM) とカリウム排水 (K⁺ : 6.41、10.25、15.38、20.51mM、PO₄-P : 6.5mM) に調整後、ホットスターラーで攪拌 (500rpm、15°C) しながら、PO₄-P と Mg²⁺ が 1:1 になるように 100mM 塩化マグネシウム水溶液をペリスタポンプ (流速 : 13 ml/h) で 1 時間添加した。また、1mM 水酸化ナトリウム水溶液を排水中の pH が pH 11 になるように適宜添加し反応させた。反応後、濾紙 (φ150mm) により反応溶液と沈殿物を分離し、濾紙に付着した沈殿物は 60°C の送風定温乾燥器で 1 時間乾燥、そして、濾液はプラスチックホルダーとメンブレンフィルター (細孔径 : 0.45μm) により再度濾過した。反応前溶液と濾液中の PO₄-P、K⁺、Mg²⁺、NH₄⁺ はそれぞれモリブデン青法、原子吸光分析装置を用いた原子吸光法と炎光光度法、インドフェノール法で測定され、沈殿物は酸溶解後に反応前溶液および濾液と同様にイオン・元素成分を分析した。

3-6-2 結果と考察

(1) 低濃度 PO₄-P 排水中からの MPP 生成

表 3-8 と表 3-9 により各設定濃度 (PO₄-P : 0.65、1.61、3.23、4.84mM) の PO₄-P 排水で MPP 生成を行ったところ、排水中の PO₄-P 濃度が上昇すると同時に PO₄-P、K⁺、Mg²⁺ 減少量は増加し、最大濃度の 4.84mM PO₄-P 含有排水中では 90.37% の PO₄-P が除去され、対して最低濃度の 0.65mM PO₄-P では 37.14% の PO₄-P が減少した。また、回収した白色沈殿物中の PO₄-P も排水中の PO₄-P の初期濃度が高いほど多く含まれており、白色沈殿物中の PO₄-P : K⁺ : Mg²⁺ の構成比を分析した結果、排水中の PO₄-P の初期濃度が 3.23mM と 4.84mM 時にほぼ 1 : 1 : 1 であった (図 3-9)。PO₄-P の初期濃度が 0.65mM では MPP の溶解度積を超えなかったために排水中の PO₄-P、K⁺、Mg²⁺ の減少量が低下し、初期濃度が 3.23mM 以上になると排水中の 90% 以上の PO₄-P を高純度の MPP として回収したと考えられた。

(2) 低濃度カリウム排水中からの MPP 生成

表 3-10 により全 K^+ 濃度の排水中でほぼ同量の $PO_4\text{-P}$ ($6.15 \pm 0.16\text{mM}$) と Mg^{2+} ($5.78 \pm 0.07\text{mM}$) が減少した。対して K^+ 減少量は K^+ の初期濃度が 6.41mM と 10.25mM 時にそれぞれ 3.76mM と 4.24mM を示し、これは $PO_4\text{-P}$ と Mg^{2+} 減少量に比べて低い値であった。表 3-11 の各 K^+ 含有排水中から除去および回収された $PO_4\text{-P}$ は 90%以上であったが、回収された白色沈殿物中の K^+ 含有量は K^+ 初期濃度が 10.25mM 以下の時に $PO_4\text{-P}$ を下回っていた (図 3-10)。 K^+ 初期濃度が 10.25mM 以下の時、MPP に比べ $Mg_3(PO_4)_2 \cdot XH_2O$ が優先的に生成されたため、白色沈殿物中の K^+ が低下したと考えられた。よって、高純度の MPP を生成するためには排水中の K^+ 濃度を 15.38mM 以上に保つことが重要と考えられる。

表 3-8 各 PO₄-P 濃度の排水中の PO₄-P, K⁺, Mg²⁺減少量

PO ₄ -P 初期濃度 [mM]	PO ₄ -P, K ⁺ , Mg ²⁺ 減少量 [mM]		
	PO ₄ -P	K ⁺	Mg ²⁺
0.65	0.26	0.26	0.16
1.61	1.02	0.85	1.24
3.23	2.83	3.33	2.96
4.84	4.60	4.11	4.35

表 3-9 各 PO₄-P 濃度の排水処理での PO₄-P 除去率と回収率

PO ₄ -P 初期濃度 [mM]	0.65	1.61	3.23	4.84
PO ₄ -P 除去率 [%]	37.14	77.86	88.99	90.37
PO ₄ -P 回収率 [%]	76.92	86.27	99.29	98.04

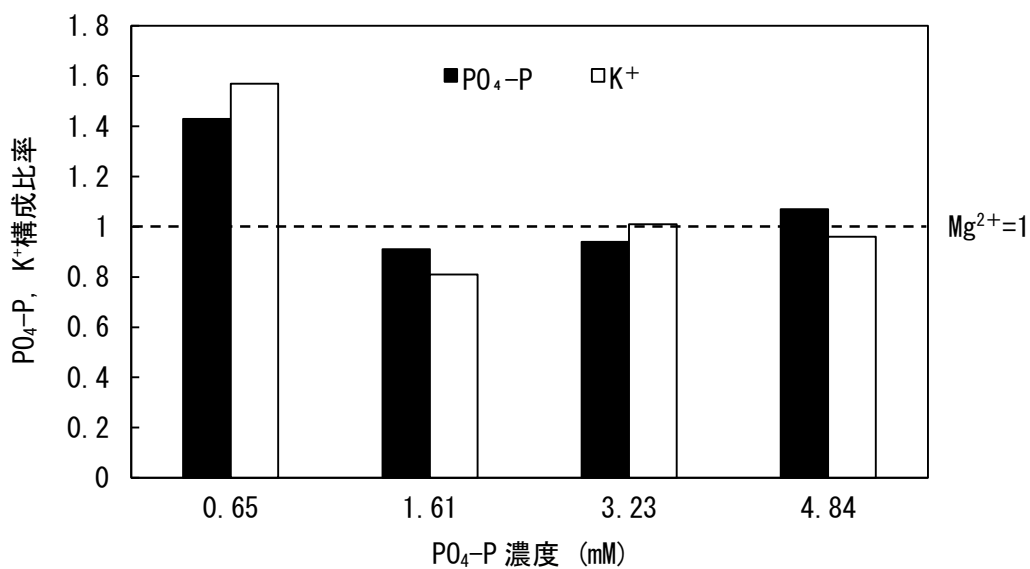


図 3-9 各 PO₄-P 濃度の排水中で生成された白色沈殿物の各イオン構成比 (Mg²⁺=1)

表 3-10 各 K⁺濃度の排水中の各イオン減少量 (PO₄-P, K⁺, Mg²⁺)

K ⁺ 初期 濃度 [mM]	PO ₄ -P, K ⁺ , Mg ²⁺ 減少量 [mM]		
	PO ₄ -P	K ⁺	Mg ²⁺
6.41	5.99	3.76	5.85
10.25	6.07	4.24	5.71
15.38	6.31	6.13	5.79
20.51	6.19	6.82	5.80

表 3-11 各 K⁺濃度の排水処理での PO₄-P 除去率と回収率

K ⁺ 初期濃度 [mM]	6.41	10.25	15.38	20.51
PO ₄ -P 除去率 [%]	96.45	98.54	99.37	99.52
PO ₄ -P 回収率 [%]	97.82	99.67	98.57	98.22

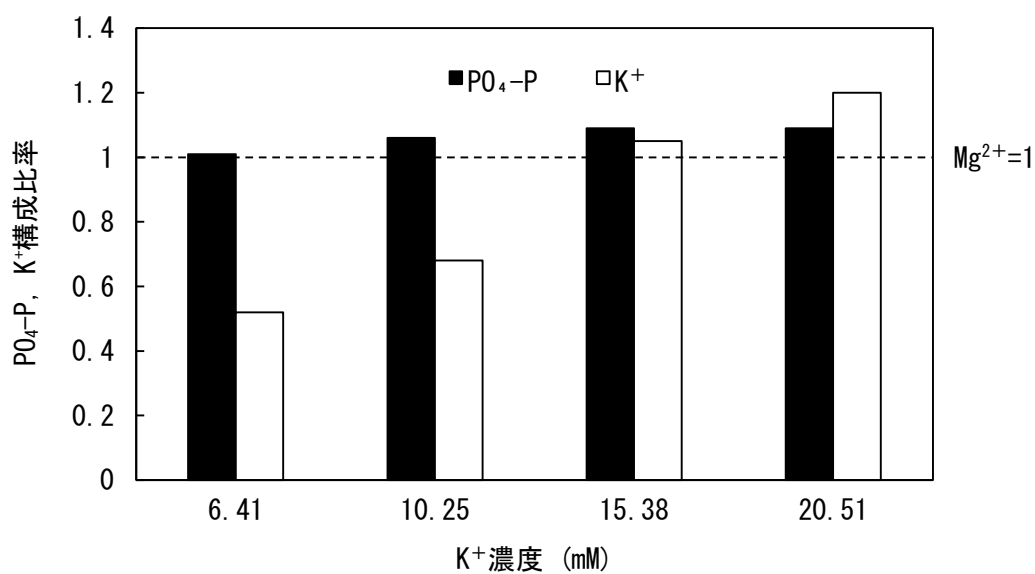


図 3-10 各 K⁺濃度の排水中で生成された白色沈殿物の各イオン構成比 (Mg²⁺=1)

3-7 連続試験による MPP 生成の検討

3-7-1 実験材料と方法

(1) 連続試験装置の設置と操作方法

図 3-11 の連続試験装置の 20L 原水槽と 10L 反応槽に、塩化カリウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化アンモニウムで模擬畜産排水 (K^+ : 25.6mM、 $PO_4\text{-P}$: 6.5mM、 NH_4^+ : 5.6mM、pH 7.5) を調整し、原水槽の排水を送液ポンプ (流量 : 7.7L/h) により反応槽へと送液しながら、 $PO_4\text{-P}$ と Mg^{2+} を 1 : 1 に維持するため、反応槽に 50mM 塩化マグネシウム水溶液を送液ポンプ (流量 : 1.5L/h) で 2 時間添加し、エアレーション方式 (流速 : 30L/h) で攪拌した。また、排水中の pH を pH 11 から pH 12 に維持するため、pH コントローラー (pHC) と水酸化ナトリウム水溶液を用い調節しながら、MPP 生成を行った。反応槽内で生成された結晶は、送液の最中に溢れ出した溶液とともに沈殿槽へと送られ、沈殿槽のコーン部に沈殿していく仕組みとなっている。反応後、各槽内の浮遊物質を沈殿させるために暫く静置し、各槽から採取した反応溶液を濾紙 ($\phi 150\text{mm}$) により濾液と沈殿物に分離した。そして、濾紙に付着した沈殿物は 60°C の送風定温乾燥器で 24 時間乾燥、そして、濾液はプラスチックホルダーとメンブレンフィルター (細孔 : 0.45 μm) で再度濾過した。

(2) 連続処理排水と沈殿物の成分分析・結晶形の観察

3-7-1 の (1) の反応前溶液と濾液中の $PO_4\text{-P}$ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 NH_4^+ をそれぞれモリブデン青法、原子吸光分析装置を用いた原子吸光法と炎光光度法、インドフェノール法で測定した。沈殿物については、電子顕微鏡による形状観察、EDS 分析、また、酸溶解後に濾液と同様の構成成分分析を行った。

3-7-2 結果と考察

(1) 連続試験装置による模擬畜産排水中の $PO_4\text{-P}$ とカリウム除去

図 3-11 の連続試験装置により模擬畜産排水 (K^+ : 25.6mM、 $PO_4\text{-P}$: 6.5mM、 NH_4^+ : 5.6mM、pH 7.5) を 2 時間処理したところ、反応槽および沈殿槽内の排水中の $PO_4\text{-P}$ と K^+ 減少量がほぼ 1 : 1 のモル量を示し、 $PO_4\text{-P}$ においては 90% 以上除去された (表 3-12)。また、pH 11 の強塩基性条件下でのアンモニアスリッピングにより排水中の NH_4^+ が半減したことから、連続試験装置により排水中で MPP を優先的に生成したと考えられ、各槽 (反応槽 : 12.92g、沈殿槽 : 17.67g) から合計 30.59g の白色沈殿物を回収し成分分析した。回収した白色沈殿物量は、連続試験装置により生成される MPP の推定量 (約 30g) とほぼ一致しており、連続試験装置により排水中の $PO_4\text{-P}$ と K^+ を MPP として大量回収したと考えられた。

(2) 反応槽と沈殿槽から回収された白色沈殿物の成分分析

EDS 分析により連続試験装置の反応槽と沈殿槽から回収された白色沈殿物中の構成成分を分析したところ、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 K 、 Mg の含有比率がほぼ 1 : 1 : 1 を示し、僅かに NH_4^+ (4%) とナトリウム (Na : 8%) が含まれていた (図 3-12)。さらに酸溶解後の成分分析結果においても、各槽内で生成された白色沈殿物中の $\text{PO}_4\text{-P} : \text{K}^+ : \text{Mg}^{2+}$ がほぼ 1 : 1 : 1 の比率で構成されており、また、電子顕微鏡による形状観察では MPP 特有の針状結晶が確認された (図 3-13、図 3-14)。各槽の白色沈殿物中から検出された NH_4^+ は、多量の塩化マグネシウム水溶液の添加により送液口周辺の排水の pH が一時的に中性付近まで低下したため、MAP が生成されたと考えられた。また、水酸化ナトリウム水溶液の添加により $\text{NaMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の生成も考えられたが、エアレーション方式による pH 上昇の転換により $\text{NaMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の生成を最小限に抑えたと考えられる【31】【76】【82】。

3-8 まとめ

本章では、模擬畜産排水中での MPP 生成の最適条件をバッチ試験により評価したところ、pH 条件の検討では pH 11 で排水中の $\text{PO}_4\text{-P}$ を最も除去し、また、MPP 特有の針状結晶を白色沈殿物として回収した。また、塩基性下で生じるアンモニアストリッピングにより NH_4^+ から生成される MAP の晶析が抑制され、pH 11 での MPP 晶析が最適であると考えられた。畜産 2 次処理排水中には高濃度の NO_3^- と SO_4^{2-} の残留が考えられ、これら共存物質による MPP 生成への影響を分析した結果、 NO_3^- 存在時の $\text{PO}_4\text{-P}$ と K^+ の減少および回収量はほとんど影響しなかったが、 SO_4^{2-} 存在時に MgSO_4 の生成や同じ 2 価の HPO_4^{2-} との競合反応により低下した。そして、 $\text{PO}_4\text{-P}$ と K^+ が低濃度で存在時の MPP 生成の影響では、各成分を一定濃度 ($\text{PO}_4\text{-P} : 3.23\text{mM}$ 、 $\text{K}^+ : 15.38\text{mM}$) 以上に維持することが高純度の MPP 生成において重要であると考えられ、以上のバッチ試験の結果を基に連続処理を行ったところ、排水中の 90% 以上の $\text{PO}_4\text{-P}$ を 30.59g の白色沈殿物として回収した。

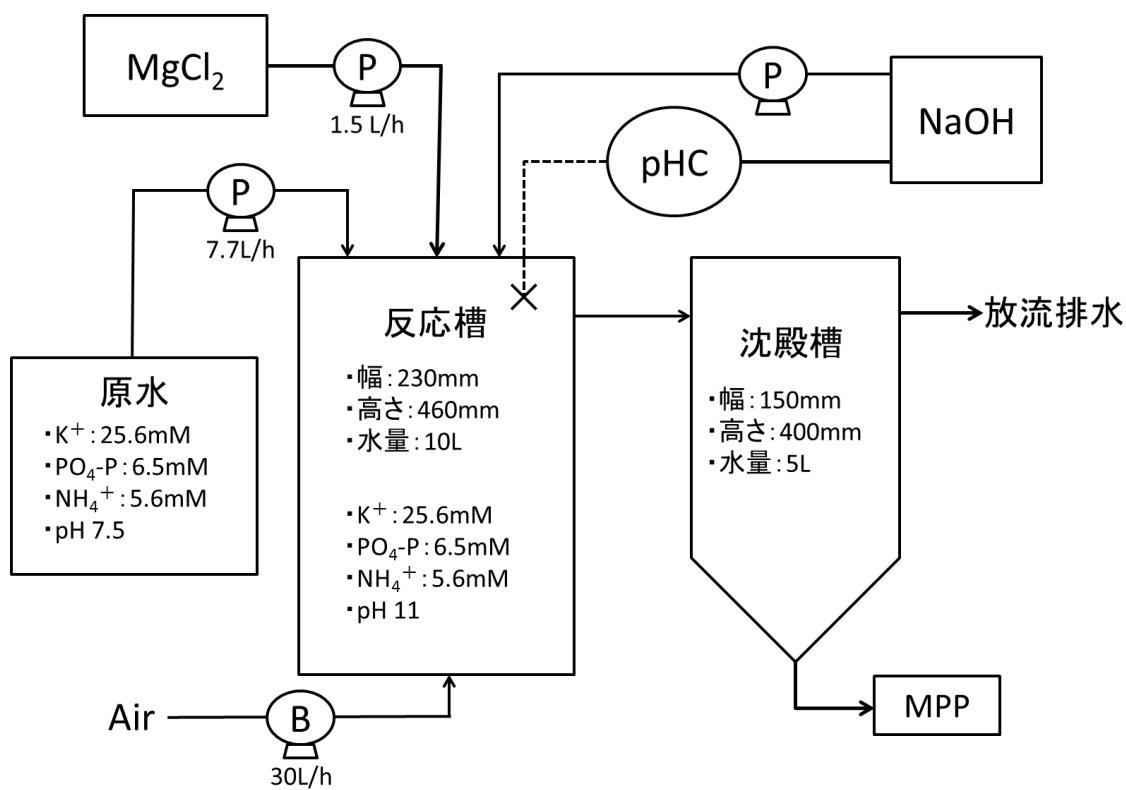


図 3-11 MPP 大量生成を目的とした連続試験装置の構造図

表 3-12 連続試験装置の反応槽、沈殿槽、放流排水中の各イオン濃度

各イオン 濃度 [mM]	反応槽		沈殿槽	放流排水
	反応前	反応後		
PO ₄ -P	6.48	0.64	0.57	0.49
K ⁺	29.74	22.87	23.13	23.67
Mg ²⁺	0.07	0.44	0.23	0.15
NH ₄ ⁺	4.78	2.02	2.02	2.12

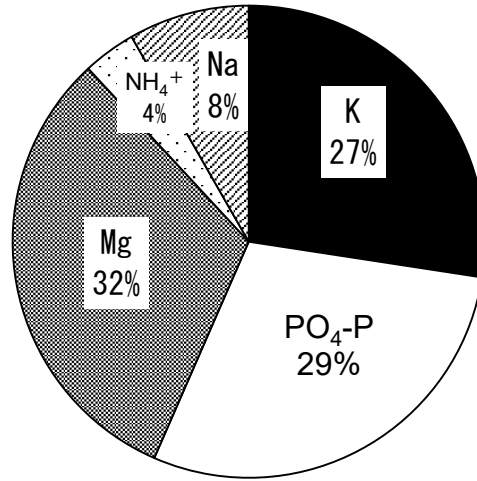


図 3-12 連続試験装置により生成された白色沈殿物中の各イオン・元素成分の含有率

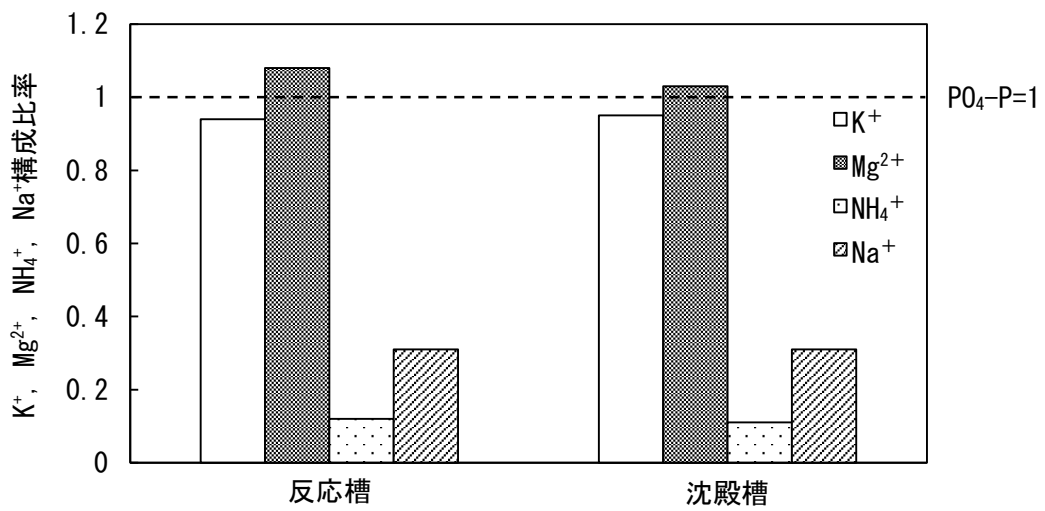


図 3-12 反応槽と沈殿槽から回収された白色沈殿物の各イオン構成比 (PO₄-P=1)

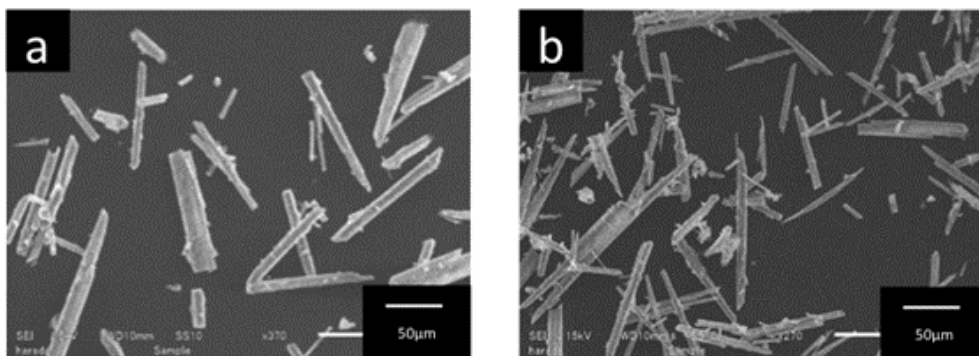


図 3-13 反応槽 (a)・沈殿槽 (b) の排水中の MPP の電子顕微鏡写真

第4章 総括

総括

第 1 章では、我が国の畜産業で発生する畜舎汚水中の窒素とリンの法的排水基準から排水処理状況を述べ、畜産 2 次処理排水中の窒素とリンの除去および回収する意義について提言した。日本の農家の大部分は、経済的な理由で十分な処理装置の設置が困難な小規模農家で占めており、多くの小規模農家から排水基準を超える窒素とリンが環境中に放出されていることが考えられた。畜舎汚水の原水には、高濃度の窒素とリンが含まれており、そのままの状態では放出されると公共用水域や水生生物に悪影響を与えることから、畜産農家は主に固液分離の 1 次処理から活性汚泥法の 2 次処理の工程を経て、汚水中の窒素とリンを排水基準まで除去している。処理後の畜産 2 次処理排水中には、アンモニウム (NH_4^+) 態窒素が他の窒素成分に比べ多く含まれている場合があり、従来水質浄化資材 (竹炭、EBB) では効果的な処理が見込めないと考えられた。また、枯渇資源のリンは排水中から回収後の再利用が望まれており、本誌では畜産 2 次処理排水中の NH_4^+ とリンを水質浄化資材およびリン晶析法により除去・回収した。

第 2 章では、水質浄化能を持つ微生物として注目されている枯草菌を担持させた水質浄化資材により、 100mg/L NH_4^+ 含有の合成排水を処理したところ、約 60% の NH_4^+ が減少し、その際に発生した硝酸イオン (NO_3^-) は最大 0.17mg/L を示した。また、処理排水中で水生生物に有毒な亜硝酸イオン (NO_2^-) は検出されず、市販の水質浄化資材 (EBB) 使用時と比べ低い結果となった。合成排水中の NH_4^+ 減少に関わったのが枯草菌の近縁種である *Lysinbacillus*, *Brevibacillus* とグラム陰性桿菌類の *Cronobacter* の微生物群であることを 16SrRNA 領域の遺伝子解析により判明した。その内の *Cronobacter* は有機酸存在下で NH_4^+ を効率良く代謝し、その際に NO_2^- と NO_3^- を生成しなかったことから、*Cronobacter* をメタン発酵処理後のパーラー排水 (消化液) 処理への利用について検討した。さらに他の微生物との集積培養で高濃度排水を処理することで知られる酵母菌との混合培養により、 NH_4^+ の分解促進を図った。まず動物性堆肥から単離した酵母菌の ITS 領域は *Candida tropicalis* の ITS 領域の遺伝子配列と高い同一性を示し、また、*Cronobacter* と同様に NH_4^+ 処理時に NO_2^- と NO_3^- を生成しなかった。つぎに *Cronobacter* と酵母菌の混合培養時には培地中の NH_4^+ を約 80% 除去し、各菌の純粋培養時の除去率に比べ高い値を示したことから、パーラー排水の消化液および原水中の有機物と窒素を効果的に処理することが期待された。

第 3 章では、浄化処理装置を想定したマグネシウム塩添加によるリン酸マグネシウムカリウム (MPP) 晶析法を利用した排水中のリン酸態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$) とカリウムの同時回収について検討した。カリウムは、リンと同じ有限な資源であり、我が国はこれら資源のほとんどを輸入で賄い、大量に排出していることから、再利用可能な高度処理での回収方法が望まれている。しかし、畜産 2 次処理排水中のリンとカリウムの最適な晶析法の条件が報告されていないことから、畜産 2 次処理排水中の MPP 生成における最適条件を検討した。まず pH 条件では、pH 11 の強塩基性条件下でのアンモニアストリッピングにより模擬畜産排水中の NH_4^+ をアンモニアとして気化しながら、 $\text{PO}_4\text{-P}$ とカリウムを MPP 特有の針状結晶が集積した白色沈殿物として回収した。つぎに NO_3^- および硫酸イオン (SO_4^{2-}) 存在下での MPP 生成の評価では、 SO_4^{2-} が MPP 生成物質の 2 価のリン酸水素イオン (HPO_4^{2-}) と競合反応したことにより、カリウムの回収量が低下し、 SO_4^{2-} に関しては事前の処理が必要と考えられた。そして、低濃度の $\text{PO}_4\text{-P}$ とカリウムイオン (K^+) 存在下では、各成分が一定濃度以上を満たしていない場合に排水中の $\text{PO}_4\text{-P}$ お

よび K^+ の除去・回収率が低下した。ここまでの結果を基に連続試験による MPP の大量生成を行ったところ、排水中の $PO_4\text{-P}$ とカリウムを 90% 以上除去し、回収した白色沈殿物量は連続試験装置により生成される MPP の推定量とほぼ一致したことから、本試験装置による実排水中からの $PO_4\text{-P}$ とカリウムを MPP として大量回収することが期待された。今後は実排水中の浮遊物質による MPP 生成への影響を評価し実用化へと繋げる。

以上により、本実験で使用した水質浄化資材は従来の資材に比べ高い NH_4^+ 処理能を持つことが評価され、また *Cronobacter* と酵母菌を利用したパーラー排水処理について検討した。そして、畜産 2 次処理排水中の $PO_4\text{-P}$ とカリウムを本実験の MPP 生成条件で除去・回収することにより、天然のリンとカリウム消費量の低減、また、閉鎖性水域の富栄養化問題の解決に繋がることを期待される。

参考文献

- 【1】 Motoko Shimura, Toshio Tabuchi (1996) The effect of pig farms with unlined manure storage ponds on nitrogen concentration in stream waters—Research on nitrogen outflow from high stocking density area (I)—, Trans. of Jsidre No.182 : 1—7.
- 【2】 Hisayoshi Mitamura (2003) Nitrate contamination of groundwater and its countermeasures, Japan atomic energy research institute : 1—54.
- 【3】 Wanami Kazuo, Shimazu Teruyuki, Hatano Kazuyuki, Yatagai Atsushi (2007) Tokyo Metro. Res. Inst. Environ. Protect : 85—93.
- 【4】 農林水産省, 畜産経営に関する排水基準について : 農林水産省 (2016.12) www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/t_info/02_haisui/
- 【5】 和木 美代子 (2013) 畜舎汚水の活性汚泥処理施設から排出される窒素の特性, 平成 25 年度家畜ふん尿処理用研究会報告書 : 11—16.
- 【6】 田邊 眞, 川村英 輔, 倉田 直亮 (2005) 家畜用浄化槽処理水中の環境汚染物質実態調査, 神畜研研報 No. 90 : 46—49.
- 【7】 Miyoko Waki, Tomoko Yasuda, Yasuyuki Fukumoto, Kazutaka Kuroda, Takahiro Sakai, Naoto Suzuki, Ryoji Suzuki, Kenji Matsuba, Kazuyoshi Suzuki (2010) Nitrogen concentrations of activated sludge process effluent of swine wastewater, Journal of Japan society on water environment Vol.33, No.4 : 33—39.
- 【8】 Tsuneo Tanaka, Toyohisa Miyamoto (2013) Simultaneous recovery of phosphorus and potassium from livestock wastewater by an electrolytic crystallization method, Trans. of Jsidre Vol.69, No.1 : 1—9.
- 【9】 Sally Jewell, Suzette M.Kimball (2016) Mineral commodity summaries 2016 : 124—125.
- 【10】 Akio Kuroda, Noboru Takiguchi, Junichi Kato, Hisao Ohtake (2005) Development of technologies to save phosphorus resources in response to phosphate crisis, Journal of environmental biotechnology Vol.4, No.2 : 87—94.
- 【11】 畜産環境整備機構 (1998) 家畜ふん尿処理・利用の手引き : 3—5.
- 【12】 羽賀清典 (2000) 糞尿処理と堆肥製造の現段階と展望, 畜産の研究 54, (1) : 132—137.
- 【13】 Paula. Ketchum (1988) Microbiology concepts and applications : 670—693.
- 【14】 Hirokazu Shirage (2005) Recovery of phosphate using MAP method, Journal of environmental biotechnology Vol.4, No.2 : 109—115.
- 【15】 Davood Nourmohammadi, Mir-Bager Esmaeeli, Hoossein Akbarian, Mohammad Ghasemian (2013) Nitrogen removal in a full-scale domestic wastewater treatment plant with activated sludge and trickling filter, Journal of environmental and public health Vol.2013 : 1—7.
- 【16】 Aya Oyama, Jumpei Miyazaki, Hayato Tokumoto, Yasuhiro Konishi, Toshiyuki Nomura (2012) Biofilm formation of denitrifying bacteria on support materials, J. Soc. Powder Technol, Japan, 49 : 883—888.

- 【17】 Yong-Ze Lu, Hou-Feng Wang, Thomas A. Kotsopoulos, Raymond J. Zeng (2015) Advanced phosphorus recovery using a novel SBR system with granular sludge in simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal process, *Appl Microbiol Biotechnol* : 1 – 8.
- 【18】 Akira Ueno, Hiromu Mori, Sinpei Harada, Atumi Nakamura (2014) Decolorize effect by nanobubble ozonize to livestock waste water treated sequencing batch reactor and high-performance membranes, *Bulletion of the Miyazaki Livestock Experiment Station Vol.26* : 119 – 122.
- 【19】 中村 修, 佐藤 剛史 (2002) 佐賀県杵島地域における家畜尿有効利用の取り組みと課題－環境コストから資源循環型農業へ－, *長崎大学総合環境研究 第4巻, 第2号* : 1–9.
- 【20】 Kazuyoshi Suzuki (2002) Removal and recovery of phosphate from swine wastewater through crystallization, *Trans. of Jsidre Vol.39, No.2* : 101 – 111
- 【21】 Shibata Takuya, Takahashi Takeshi, Tanaka Tsuneo, Ozaki Masuo (2006) The effects of using carbon fiber as contact medium on biofilm treatment, *Trans. of Jsidre, No.244* : 227 – 235.
- 【22】 Nobuhiro Matsunaga, Sousuke Masuda, Takahisa Tokunaga, Shinichiro Yano, Hideo Oshikawa, Kazuo Fujita, Masayuki Koga, Toshiaki Iwashita, Atsuhiko Harada (2006) Capacity of water quality purification by eco bio-block (EBB) in a closed water system, *Engineering sciences reports, Kyushu University Vol.28, No.2* : 247 – 253.
- 【23】 Masayuki Banno, Takahiro Kuba, Kosuke Sano, Naoya Kwamura, Shumpei Ichikawa, Yusuke Sakai (2009) Capacity and mechanism of nitrate anion adsorption onto bamboo charcoal, *Journal of Japan society on water environment Vol.32, No.7* : 369 – 374.
- 【24】 Shibata Takuya, Takahashi Takeshi, Tanaka Tsuneo, Ozaki Masuo (2006) The effects of using carbon fiber as contact medium on biofilm treatment, *Trans. of Jsidre, No.244* : 227 – 235.
- 【25】 福地 哲郎, 山内 博利, 高橋 克嘉, 小玉 義和 (2001) 生物木炭を用いた簡易生活排水処理装置の開発, *宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, 46号* : 21–23.
- 【26】 Xiao-ling Zou (2015) Treatment of heavy oil wastewater by UASB-BAFs using the combination of yeast and bacteria, *Environmental technology Vol.36, No. 18* : 2381 – 2389.
- 【27】 Tiwari S, Gaur R, Singh A (2014) Distillery spentwash decolorization by a novel consortium of *Pediococcus acidilactici* and *Candida tropicalis* under static condition, *Pakistan Journal of biological sciences, 17.6* : 780 – 791.
- 【28】 Kawai Tam, Ching-Hong Yang, Mark R. Matsumoto, David E. Crowley, John D. Sheppard (2005) Comparison of PCR-DGGE and selective plating methods for monitoring the dynamics of a mixed culture population in synthetic brewery wastewater, *Biotechnol. Prog., 21* : 712 – 719.
- 【29】 星野 保, 辻 雅晴, 横田 祐司, 工藤 栄, 内海 洋, 湯本 勲 (2016) Non-conventional yeasts 特集 (後編) 南極産酵母の環境適応機構の解明とその産業利用, *生物工学会誌 第94巻, 第6号* : 329 – 331.

- 【30】 Hiroshi Tsuno, Fumitake Nishimura, Isao Somiya (1994) Removal of ammonium nitrogen in bio-zeolite reactor, *Trans. of Jsidre*, No.503 : 159–166.
- 【31】 Simon G, Romana M-L (2010) Effect of pH, temperature and air flow rate on the continuous ammonia stripping of the anaerobic digestion effluent, *Process safety and environmental protection*, 89 : 61–66.
- 【32】 Lukhanyo Mekuto, Seten Karabo Obed Ntwampe, Vanessa Angela Jackson (2015) Biodegradation of free cyanide and subsequent utilization of biodegradation by-products by *Bacillus* consortia : Optimisation using response surface methodology, *Environ Sci Pollut Res*, 22 : 10434–10443.
- 【33】 Naoki Morimoto (2011) Effect of adding ammonia-oxidizing bacteria to ammonia emission during the composting process of animal wastes, *Bulletion of Tokyo metropoliation agriculture and foredtry research center*, 6 : 19–23.
- 【34】 Zhen Hu, Jian Zhang, Huijun Xie, Shuang Liang, Shanping Li (2013) Minimization of nitrous oxide emission from anoxic-oxic biological nitrogen removal process : Effect of influent COD/NH₄⁺ ratio and feeding strategy, *Journal of bioscience and bioengineering* Vol.115, No.3 : 272–278.
- 【35】 Tatsuo Sumino, Naomichi Mori, Takako Ogasawara, Kazuhiro Tanaka (2000) Growth characteristics and nitrification rate of nitrifying bacteria entrapped in pellets, *Journal of Japanese society of water treatment biology* Vol.36, No.4 : 173–181.
- 【36】 Jeanne M. Minnerath, Jenna M. Roland, Lucas C. Rossi, Steven R. Weishalla, Melissa M. Wolf (2009) A comparision of heat versus methanol fixation for gram staining bacteria, *Bioscene* Vol.35 : pp.36–41.
- 【37】 Mazidatul Ashiqeen, Balqiah Mohamad Lazim, Chin Hong Neoh, Chi Kim Lim, Chun Shiong Chong, Zaharah Ibrahim (2016) Biofilm-coated macrocomposites for the treatment of high strength agricultural wastewater, *Journal of desalination and water treatment* Vol.57, No.8 : 3424–3429.
- 【38】 S. Mnif, M. Chamkha, M. Labat, S. Sayadi (2011) Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria, *Journal of applied microbiology* 111 : 525–536.
- 【39】 Hikyung Kim, Jee-Hoon Ryu, Larry R. Beuchat (2006) Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes, *Applied and environmental microbiology* Vol.72, No.9 : 5846–5856.
- 【40】 Joanne V. Hamilton, Michael J. Lehane, Henk R. Braig (2003) Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*, *emerging infectious diseases* Vol.9, No.10 : 1355–1356.

- 【41】 Yousra Turki, Ines Mehri, Rim Lajnef, Asma Ben Rejab, Amel Khessairi, Hanene Cherif, Hadda Ouzari, Abdennaceur Hassen (2016) Biofilms in bioremediation and wastewater treatment : characterization of bacterial community structure and diversity during seasons in municipal wastewater treatment process, *Environ Sci Pollut Res* : 1–12.
- 【42】 Sangeeta Yadav, Ram Chandra (2012) Biodegradation of organic compounds of molasses melanoidin (MM) from biomethanated distillery spent wash (BMDS) during the decolourisation by a potential bacterial consortium, *Biodegradation*, 23 : 609–620.
- 【43】 Ram Chandra, Ram Naresh Bharagava, Atya Kapley, Hemant J. Purohit (2011) Bacterial diversity, organic pollutants and their metabolites in two aeration lagoons of common effluent treatment plant (CETP) during the degradation and detoxification of tannery wastewater, *Bioresource technology* 102 : 2333–2341.
- 【44】 M. Keyser, R.C. Witthuhn, L.-C. Ronquest, T.J. Britz (2003) Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB) – granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*, *Biotechnology letters* 25 : 1893–1898.
- 【45】 Cueto-Rojas HF, Maleki Seifar R, Ten Pierick A, van Helmond W, Pieterse M M, Heijnen JJ, Wahl SA (2016) In vivo analysis of NH_4^+ transport and central N-metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under aerobic N-limited conditions, *Applied and environmental microbiology* : 6831–6845.
- 【46】 Katrin Gunka, Fabian M. Commichau (2012) Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis* : a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation, *Molecular microbiology*, 85 : 213–224.
- 【47】 Koichi Masaki, Hiroyuki Kurata (2006) A Simple model of positive feedback of the nitrogen assimilation system in *E. coli*, *IPJS SIG Technical report* : 61–64.
- 【48】 H. Sasaki, H. Yano, T. Sasaki, Y. Nakai (2005) A survey of ammonia-assimilating microorganisms in cattle manure composting, *Journal of applied microbiology*, 99 : 1356–1363.
- 【49】 畜産環境技術研究所, 第 I 章 畜産汚水処理の基本及び汚水処理方法の種類と特徴 : (2016・12) <http://www.chikusan-kankyo.jp>
- 【50】 Kazutaka Kuroda, Dai Hanajima, Yasuyuki Fukumoto, Kazuyoshi Suzuki, Shinichi Kawamoto, Jun Shima, Kiyonori Haga (2004) Isolation of thermophilic ammonium tolerant bacterium and its application to reduce ammonia emission during composting of animal wastes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 : 286–292.
- 【51】 Eva Albers, Christer Larsson, Gunnar Liden, Claes Niklasson, Lena Gustafsson (1996) Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation, *Applied and environmental microbiology* Vol.62, No.9 : 3187–3195.
- 【52】 Alejandra Bravo, Jaime Mora (1988) Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway, *Journal of bacteriology* Vol.170, No.2 : 980–984.

- 【53】 森永 泰子 (1981) *Micrococcus luteus* のアンモニア同化に關与する酵素の活性におよぼす培養条件の影響, 生活科学 第 13 卷, 第 2-3 号 : 21-30.
- 【54】 Minoru Nagasaka, Yoshinori Sato, Xuan Wang (1998) The effect of the loading of organic matters on the nitrification rates in activated sludge process, Journal of environmental conservation engineering Vol.27, No.4 : 282-288.
- 【55】 Long-Jie Guo, Bin Zhao, Qiang An, Meng Tian (2016) Characteristics of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Enterobacter cloacae* strain HNR, Appl Biochem Biotechnol, 178 : 947-959.
- 【56】 Fadia Ben Taheur, Kais Fdhila, Hamouda Elabed, Amel Bouguerra, Bochra Kouidhi, Amina Bakhrouf, Kamel Chaieb (2016) Molecular identification of potential denitrifying bacteria and use of D-optimal mixture experimental design for the optimization of denitrification process, Microbial pathogenesis, 93 : 158-165.
- 【57】 Shigeo Miyao, Toshio Ogawa (1990) Effect of surrounding factors on nitrite production by bacteria related to the fermented pickles, Nippon shokuhin kogyo gakkaiishi Vol.37, No.9 : 670-675.
- 【58】 Kohsuke Sekine, Yukiko Sakakibara, Toshiharu Hase, Naoki Sato (2011) A novel variant of sulfite reductase preferentially reducing nitrite in *Cyanidioschyzon merolae*, The Japanese society of photosynthesis research, 21 : 59-64.
- 【59】 Alex G. Sieg, Pamela J. Trotter (2014) Differential contribution of the proline and glutamine pathways to glutamate biosynthesis and nitrogen assimilation in yeast lacking glutamate dehydrogenase, Microbiological research, 169 : 709-716.
- 【60】 Kenichi Sajiki, Tomas Pluskal, Mizuki Shimanuki, Mitsuhiro Yanagida (2013) Metabolomic analysis of fission yeast at the onset of nitrogen starvation, Metabolites, 3 : 1118-1129.
- 【61】 G. Cebrian, C. Arroyo, P. Manas, S. Condon (2014) Bacterial maximum non-inhibitory and minimum inhibitory concentrations of different water activity depressing solutes, International journal of food microbiology, 188 : 67-74.
- 【62】 Toshio Matsuda, Toshihiro Yano, Akihiro Maruyama, Hidehiko Kumagai (1994) Antimicrobial activities of organic acids determined by minimum inhibitory concentrations at different pH ranged from 4.0 to 7.0, Nippon shokuhin kogyo gakkaiishi Vol.41, No.10 : 687-702.
- 【63】 Akio Taki, Taizo Miwa, Makoto Hisamatsu, Tetsuya Yamada (1987) Studies on valute-added utilization of corn steep liquor, a byproduct of the corn starch plant : Part 1. Selection of yeast well-grown in corn steep liquor, The bulletin of the faculty of agriculture, Mie University, 75 : 53-57.
- 【64】 D. P. Henry, Ruth H. Thomson, D. J. Sizemore, J. A. O'leary (1976) Study of *Candida ingens* grown on the supernatant derived from the anaerobic fermentation of monogastric animal wastes, Applied and environmental microbiology Vol.31, No.6 : 813-818.

- 【65】 Chun Ying, Kazutaka Umetsu, Ikko Ihara, Yasuzo Sakai, Takaki Yamashiro (2010) Simultaneous removal of organic matter and nitrogen from milking parlor wastewater by a magnetic activated sludge (MAS) process, *Bioresource technology* 101 : 4349–4353.
- 【66】 Toshihiro Kojima, Seiji Honma, Hidetoshi Ishii, Hiroyoshi Emori, Tooru Kazui (2002) Operating condition of crystallization process for phosphate-rich wastewater, *Environmental engineering research* Vol.39 : 307–315.
- 【67】 Harada Hiroyuki, Hirota Ryuji, Mura Yuji, Fujii Masahiro, Matushita Tomohiro (2002) MAP (magnesium ammonium phosphate) crystallization for phosphorus removal from side streams, *Environmental engineering research* Vol.39 : 297–306.
- 【68】 Satoshi Nakao, Takayuki Nishio, Yoshinori Kanjo (2016) Simultaneous recovery of phosphorus and potassium as magnesium potassium phosphate from synthetic sewage sludge effluent, *Environmental Technology* : 1–11.
- 【69】 Hiroyuki Harada, Satoshi Yamaguchi, Seichiro Ohura, Hidetaka Kawakita, Koutaro Akagi (2014) The effects of operation factors on $MgKPO_4$ crystals, *Trans. of Jsidre* Vol.70, No.7 : 277–284.
- 【70】 Yamaguchi Satoshi, Ohura Seichiro, Harada Hiroyuki, Akagi kotaro, Yoshiharu Mitoma, Kawakita Hidetaka, Biplob K. Biswas (2013) Simultaneous crystallization of phosphate and potassium as magnesium potassium phosphate using bubble column reactor with draught tube, *Journal of environmental chemical engineering*, 1 : 1154–1158.
- 【71】 Tsuneo Tanaka, Toyohisa Miyamoto (2013) Simultaneous recovery of phosphorus and potassium from livestock wastewater by an electrolytic crystallization method, *Trans. of Jsidre* Vol.69, No.1 : 1–9.
- 【72】 Shinichi Yamazaki, Takashi Yamaguchi, Nobuo Araki, Haruhiko Sumino, Hideki Harada (2006) Removal of organics and nitrogen in artificial sewage by a combined system of two-step UASB reactor and aerobic biofilm reactor, *Trans. of Jsidre* Vol.62, No.1 : 9–16.
- 【73】 Takuma Kawaharazuka, Atsushi Yatagai, Hiroshi Masujima (2001) Denitrification of underdrainage by granulated sulfur-limestone mixture, *Jour. Agri. Sci., Tokyo Nogyo Daigaku*, 46 : 7–12.
- 【74】 Kangning Xu, Chengwen Wang, Xiaoxue Wang, Yi Qian (2012) Laboratory experiments on simultaneous removal of K and P from synthetic and real urine for nutrient recycle by crystallization of magnesium-potassium-phosphate-hexahydrate in a draft tube and baffle reactor, *Chemosphere* Vol.88, No.2 : 219–223.
- 【75】 Kouji Maeda, Kenji Imura, Hidetoshi Kuramochi, Keisuke Fukui (2012) Solubility of phosphoric salts in aqueous solutions and its applications, *Bulletin of the society of sea water science Japan*, 66 : 314–318.
- 【76】 Juan Tong, Yinguang Chen (2009) Recovery of nitrogen and phosphorus from alkaline fermentation liquid of waste activated sludge and application of the fermentation liquid to promote biological municipal wastewater treatment, *Water research*, 43 : 2969–2976.

- 【77】 Izumi Hirasawa, Kyoko Ishibashi (2008) Recovery of anion in the wastewater as resources based on crystallization engineering, *Journal of MMIJ* Vol.124 : 1–6.
- 【78】 道木 英之, 宮川 久司 (2008) 新しい排煙脱硫プロセスの開発, *技術革新と社会変革* Vol.1, No.1 : 33–40.
- 【79】 中尾 賢志, 西尾 孝之 (2013) 浄水発生土によるリン回収過程における各種元素の挙動と KMP としての回収可能性, *大阪市立環科研報告* 第 75 集 : 45–49.
- 【80】 Ying Shen, Zhi-Long Ye, Xin Ye, Jie Wu, Shaohua Chen (2016) Phosphorus recovery from swine wastewater by struvite precipitation : compositions and heavy metals in the precipitates, *Desalination and water treatment* Vol.57, No.22 : 10361–10369.
- 【81】 Y Dilsad Yilmazel, Goksel N Demirer (2013) Nitrogen and phosphorus recovery from anaerobic co-digestion residues of poultry manure and maize silage via struvite precipitation, *Waste management & research*, 31 : 792–804.
- 【82】 Jose A. Fernandez Lozano, Ana R. Colmenarse, Damaris Rosas (1999) A novel process for the production of multinutrient phosphatic base fertilizers from seawater bittern and phosphoric acid, *Comunicaciones reports comunicacoes* Vol.24, No.5 : 317–320.
- 【83】 Toshihiro Tanaka, Kazuaki Shimamura (2005) Biological wastewater treatment process with chemical-phosphorus recover reactor, *Journal of environmental biotechnology* Vol.4, No.2 : 101–108.
- 【84】 Ariumi Kawamoto, Akira Ookubo, Toshio Sato, Takashi Suzuki (1999) Phosphorous removal from wastewater by layer structure inorganic ion exchanger with high selectivity to phosphate anion, *Journal of Japan society on water environment* Vol.22, No.11 : 875–881.
- 【85】 Tamotsu Yasue, Yoshiyuki Kojima, Hiroaki Inoue, Yasuo Arai (1990) Decrease of the solubility of gypsum by incorporation of phosphate ion, *Journal of the ceramic society of Japan*, 98 : 483–489.

謝辞

本研究の進行にあたり、ご指導ご鞭撻いただいた主査の原田 浩幸 教授および副査の森永 力 名誉教授、八木 俊樹 教授、阪口 利文 准教授には心から感謝いたします。また、水質浄化資材を提供して頂いた多機能フィルター株式会社の社員皆様、そして、実験に当たり協力していただいた環境システム工学研究室の卒業生および在学生の皆様にはこの場をお借りしお礼申し上げます。

付録

・ SS	浮遊物質
・ CFU	生菌数
・ ORP	酸化還元電位
・ OD	濁度
・ TN	全窒素
・ ORG-N	有機態窒素
・ TOC	全炭素
・ ORG	有機物
・ EBB	エコ・バイオブロック
・ HAP	ヒドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$)
・ MAP	リン酸マグネシウムアンモニウム ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
・ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	D-グルコース
・ PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
・ 16SrRNA	リボソームを構成する RNA
・ ITS	内部転写領域
・ DDBJ	日本 DNA データバンク
・ SCP	単細胞タンパク
・ YPD 培地	酵母専用培地
・ MPP	リン酸マグネシウムカリウム ($\text{KMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
・ $\text{PO}_4\text{-P}$	リン酸態リン
・ $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	リン酸一水素マグネシウム 3 水和物
・ $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$	リン酸マグネシウム水和物
・ $\text{NaMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	リン酸マグネシウムナトリウム 6 水和物