

(41) スポンジ - エアリフト型リアクターによる 亜硝酸型硝化に及ぼすアンモニア濃度と温度の影響

阿部 憲一^{1*}・大橋 晶良¹・井町 寛之²・原田 秀樹³・徳富 孝明⁴

¹長岡技術科学大学 環境システム系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

²海洋研究開発機構 極限環境生物圏研究センター (〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2 番地 15)

³東北大学大学院工学研究科 土木工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6)

⁴栗田工業株式会社 (〒329-0105 栃木県下都賀郡野木町川田五丁山 1-1)

* E-mail: abeken@stn.nagaokaut.ac.jp

スポンジ担体を充填したエアリフト型リアクターを用いて、アンモニア流入負荷を段階的に上げて運転したところ、流出水中に残存するアンモニア性窒素濃度の増加に伴い、亜硝酸性窒素の蓄積が確認された。亜硝酸性窒素の濃度比は、温度や残存するアンモニア性窒素濃度よりも、遊離アンモニア濃度と強い相関性があることが示された。遊離アンモニア濃度が $8 \text{ mg NH}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 付近での亜硝酸性窒素の濃度比は 0.8 と、良好な亜硝酸性窒素の蓄積が確認されたことから、遊離アンモニア濃度は亜硝酸型硝化を制御するうえで重要な因子の一つであることが示唆された。また完全硝化時には *Nitrospira* に属する亜硝酸酸化細菌が、亜硝酸型硝化時には *N. europaea* に近縁なアンモニア酸化細菌が優占的に存在していた。

Key Words: Airlift reactor, Ammonia oxidizing bacteria, Free ammonia, Partial nitrification, Sponge carriers

1. はじめに

硝化・脱窒に代表される生物学的窒素除去法は、今日の社会に広く普及している窒素除去プロセスであるが、硝化のための曝気、脱窒の際の有機物添加、余剰汚泥の発生といった運転及び処分コスト面での問題を抱えている。これに対して近年考案された亜硝酸型硝化と嫌気的アンモニア酸化 (Anammox) を組み合わせた新たな窒素除去プロセスでは、大幅な曝気電力の削減、有機物無添加での脱窒反応が可能となった¹⁾。このプロセスにおいて亜硝酸型硝化は、後段の Anammox 反応槽への基質 (NH_4^+ , NO_2^-) の供給を担っていることから、亜硝酸型硝化の制御・安定化は必要不可欠であり、このプロセスの実用化にあたっては最重要課題の一つである。

これまでに亜硝酸型硝化を引き起こす要因としては pH、温度²⁾、溶存酸素 (DO)³⁾、アンモニア流入負荷⁴⁾、遊離アンモニア (NH_3)⁵⁾などが報告されている。これらの要因を複合的に取り入れた SHARON プロセス²⁾や、

CANON や OLAND といった低酸素条件下で Anammox までの同時進行を目的とした研究も行われており^{6,7)}、SHARON プロセスにおいては実プラントが稼動している。エアリフト型リアクターに対しては、DO 制御による亜硝酸型硝化について報告されている⁸⁾。Oyanedel-Craver らは生物膜と浮遊汚泥で比較を行い、生物膜の方がより高い DO ($<4 \text{ mg-O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) での亜硝酸性窒素の蓄積が可能であることを報告している⁹⁾。

この亜硝酸型硝化・Anammox 窒素除去プロセスを実用化する場合、前段の亜硝酸型硝化反応槽には担体を充填したエアリフト型リアクターを採用することが一つの有効的な方法である。この理由としては汚泥浮遊型のリアクターに比べ、HRT に対し長時間の SRT を確保できることが挙げられる。担体内に微生物を保持できるため、リアクターとして高濃度の汚泥保持が可能となり、また汚泥の流出によるプロセスの破綻も防止できる。

エアリフト型リアクターを Anammox 反応槽の前段処理として実用化させるには、前述した DO 以外の他の要

因 (pH, 温度, アンモニア流入負荷, 遊離アンモニアなど) に対しても, 亜硝酸型硝化に対する影響を明らかにする必要がある。そこで本研究では, 担体を充填したエアリフト型リアクターでの亜硝酸型硝化に及ぼす温度とアンモニア流入負荷の影響と, 亜硝酸型硝化の制御の可能性を評価することを目的とし, 温度条件の異なるリアクターに対しアンモニア流入負荷を段階的に上げて運転を行った。また, 分子生物学的手法を用いてリアクター内の微生物種を特定し, 完全硝化時と亜硝酸型硝化時での微生物種の比較を行った。

2. 実験方法

(1) 実験装置および運転条件

実験装置には担体を充填したエアリフト型のベンチスケールリアクターを採用し, 設定温度は 35°C (RUN1), 30°C (RUN2), 25°C (RUN3) の 3 条件に定めた。実験装置の概略図を Figure 1 に示す。リアクターの有効容積は 3L, スポンジ担体 (ポリウレタン製, 3×3×3mm) の充填率は 30%として, 植種汚泥には下水処理場の返送汚泥を用いた。リアクター内の温度制御にはウォータージャケット型式を採用し, ウォーターバスで加温した水道水を循環させることで, 設定温度 $\pm 1^\circ\text{C}$ で制御した。pH は pH コントローラー (mk-250Tubing Pump, ASR) によりオンサイトで連続的に測定しており, 硝化反応に伴い pH が低下するつど NaOH (40g・L⁻¹) を自動で添加して pH7.5 $\pm$ 0.1 で制御した。曝気量は DO を 4・6 mg・O₂・L⁻¹ で維持でき, 担体が滞りなく循環する量に調整した。

供給した人工排水の組成は Table 1 に示した通りであり, アンモニア性窒素源には (NH₄)₂SO₄ を, 亜硝酸性窒素源には NaNO₂ を用いた。人工排水の供給は流量 0.6 $\pm$ 0.02 L・h⁻¹ での連続供給で HRT は 5 時間一定としたため, アンモニア流入負荷の変更はアンモニア性窒素濃度で調整した。本実験は段階的にアンモニア性窒素濃度を上げていった 4 つの Phase で構成されている。Table 2 には各 Phase の人工排水中の窒素源および濃度, アンモニア流入負荷, リアクター内の平均 DO 濃度を示した。リアクターの立ち上げ期間である Phase1 のみ, スポンジが滞らない最低限の曝気量で運転を行ったが, リアクター内の微生物量が少なく, 酸素消費量もわずかであったことから DO は初期設定値よりも高い値であった。

(2) 水質分析

リアクター流入水 (人工排水) 中のアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素, リアクター流出水中のアンモニア性窒素, 亜硝酸性窒素, 硝酸性窒素の各濃度は比色測定法

(DR/2000, HACH) により測定を行った。流入水はリアクターに滴下される直前に, 流出水はリアクター内から溢れ出したものを採取した。硝酸性窒素濃度の測定の際は, 混在する亜硝酸性窒素により阻害を抑制するために, 同社のキットを用いて臭素とフェノールによる前処理を行った。

その他の測定項目である温度は棒状温度計, pH は pH-controller (mk-250PH, ASR) によるオンサイトでの測定を行った。温度と pH は全実験期間を通して, 概ね初期設定値を維持していた。DO はポータブル DO 計 (DO-5509, カスタム) を用い, 1 日 1 回の測定を行った (Table 2)。また各 Phase の終了時にはスポンジ担体内の TS, VS の測定を行った。

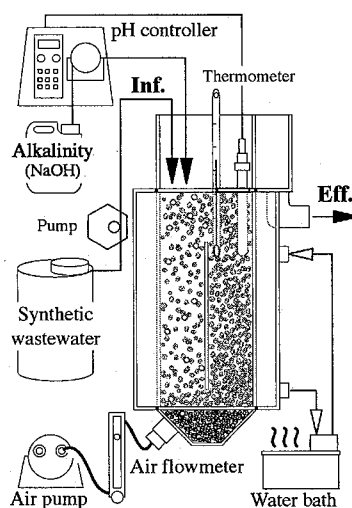


Figure 1. Schematic diagram of a sponge-airlift reactor used in this study for control of partial nitrification.

Table 1. Composition and concentration of the synthetic wastewater

Components	Final conc.	Components	Final conc.
Synthetic wastewater		Ferrum solution	
(NH ₄) ₂ SO ₄ Phase1	0.21 g・L ⁻¹	EDTA・2Na	5 mg・L ⁻¹
	2 0.43 g・L ⁻¹	FeSO ₄ ・7H ₂ O	5 mg・L ⁻¹
	3 1.07 g・L ⁻¹	Trace metals solution	
	4 2.14 g・L ⁻¹	EDTA・2Na	2.5 mg・L ⁻¹
NaNO ₂ Phase1	0.22 g・L ⁻¹	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.43 mg・L ⁻¹
	2-4 - g・L ⁻¹	CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.24 mg・L ⁻¹
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.2 g・L ⁻¹	MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.99 mg・L ⁻¹
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.02 g・L ⁻¹	CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.25 mg・L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.11 g・L ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.22 mg・L ⁻¹
Ferrum sol.	0.1 mL	NiCl ₂ ・6H ₂ O	0.19 mg・L ⁻¹
Trace metals sol.	0.1 mL	Na ₂ SeO ₄	1.08 mg・L ⁻¹
		H ₃ BO ₄	0.14 mg・L ⁻¹

Table 2. Operating condition applied to all reactors.

Phase	Day	Nitrogen source (mgN·L ⁻¹)	ALR ^a (kgN·m ⁻³ ·day ⁻¹)			Dissolved oxygen (mgO ₂ ·L ⁻¹)		
			RUN1 (35°C)	RUN2 (30°C)	RUN3 (25°C)	RUN1 (35°C)	RUN2 (30°C)	RUN3 (25°C)
1	0 - 25	NH ₄ ⁺ : 45, NO ₂ ⁻ : 45	0.212	0.209	0.21	6.4	6.6	7.4
2	26 - 51	NH ₄ ⁺ : 90	0.436	0.434	0.459	5.9	5.9	6.4
3	52 - 81	NH ₄ ⁺ : 225	1.056	1.04	1.061	4.8	4.7	5
4	82 - 124	NH ₄ ⁺ : 450	2.032	1.92	2.046	4.7	4.7	5

^a ALR : Ammonium Loading Rate

(3) 16SrRNA 遺伝子に基づいた微生物群集の解析

Phase 2から3への切り替え時にあたる運転51日目と、Phase 4の運転終了日のスポンジ内バイオマスに対してクローン解析を行った。実験結果にて後述するが、全実験系ともに運転51日目は完全硝化が、運転終了日は亜硝酸型硝化が進行していた。採取した試料からのDNA抽出にはBead-beater法を用い、フェノール・クロロホルムで処理した後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。PCRにはEUB338F-mix (3'-ACTCCTACGGGAGG CAGC-5', 3'-ACTCCTACGGGAGGCTGC-5', 3'-ACAC CTACGGGTGGCTGC-5', 3'-ACACCT ACGGGTGGC AGC-5')とUNIV1500R (3'-GGHTACCTTGTTACGA CTT-5')のプライマーセットを用いて、Bacteriaの16SrRNA遺伝子域を特異的に増幅した。得られたPCR産物はMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製を行い、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen)によってクローン化した。形成したコロニーからランダムにクローンを選択し、プラスミドから単一の16SrRNA遺伝子断片を回収した後、制限酵素HaeIII, TaqIによりRFLP解析を行い、グループ分けをした。その後、塩基配列自動解析装置(CEQ8000, BECKMAN COULTER)により塩基配列を決定し、Arbを用いて16SrRNA遺伝子に基づいた系統樹を作成した。

3. 実験結果

(1) リアクターの運転結果

Figure 2に異なる温度条件で運転した3台のリアクター(RUN1:35°C, RUN2:30°C, RUN3:25°C)のアンモニア性窒素(NH₄⁺-N)、亜硝酸性窒素(NO₂⁻-N)、硝酸性窒素(NO₃⁻-N)、各濃度の経時変化を示した。

a) Phase1 (Day 0 - 25)

リアクターの立ち上げ期間では、人工排水中の窒素源をNH₄⁺-N, NO₂⁻-Nとし、共に平均0.21 ± 0.002 kg·m⁻³·day⁻¹の容積負荷で供給した。運転9日目までに全てのRUNにおいて、流出水中のアンモニア性窒素の

減少と亜硝酸性窒素の増加が確認された。運転9日目以降、亜硝酸性窒素の減少に伴い硝酸性窒素の生成が進行し始め、運転18日目には流入窒素源の90%以上が硝酸性窒素に変換された。その後、全てのRUNで完全硝化が進行し続けた。Phase 1終了時のスポンジ内のTS, VS(単位: g·L⁻¹スポンジ体積)はそれぞれ1.17, 0.33(RUN1), 0.44, 0.39(RUN2), 0.33, 0.33(RUN3)であった。

b) Phase 2 (Day 26 - 51)

この期間では人工排水中の窒素源をNH₄⁺-Nのみとし、平均0.445 ± 0.013 kg·m⁻³·day⁻¹の容積負荷で供給した。アンモニア流入負荷を上げた直後、RUN2のみ流出水中に一時的なアンモニア性窒素の残存が確認されたが(運転29日目, 20 mgNH₄⁺-N·L⁻¹)、これはpH-controllerのトラブルによりアルカリ剤の供給が停止し、リアクター内のpHが低下したことが原因である。その後は硝酸性窒素のみの生成が確認されており、完全硝化が引き続き進行していた。RUN1, RUN3においても、流出水中のアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素は検出されず、完全硝化の進行が確認された。Phase 2終了時のスポンジ内のTS, VS(単位: g·L⁻¹スポンジ体積)はそれぞれ6.17, 5.06(RUN1), 5.78, 5.44(RUN2), 4.06, 3.89(RUN3)であった。

c) Phase 3 (Day 52 - 81)

この期間でも人工排水中の窒素源はNH₄⁺-Nのみとし、平均1.05 ± 0.011 kg·m⁻³·day⁻¹の容積負荷で供給した。アンモニア流入負荷を上げた直後、全てのRUNにおいて流出水中にアンモニア性窒素の残存が確認された。各RUNの間で初期のアンモニア性窒素の残存量に大きな違いは見られなかったが、その後の挙動に顕著な差が現れた。RUN1ではアンモニア性窒素の残存量は運転57日目で100 mgNH₄⁺-N·L⁻¹程度まで増加したが、その後急速に減少して40 mgNH₄⁺-N·L⁻¹以下で残存し続けた。アンモニア性窒素の減少が見られた運転60日目からは、亜硝酸性窒素の蓄積が確認され始めた。亜硝酸性窒素の蓄積量は徐々に増加し、運転69日目で110 mgNO₂⁻-N·L⁻¹に達した後も100 mgNO₂⁻-N·L⁻¹程度の蓄積量を維持していた。硝酸性窒素の生成量はアンモニア流入負荷を上

げた直後は $173 \text{ mgNO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ まで増加したが、その後緩やかに減少していき最低で $110 \text{ mgNO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。RUN2 ではアンモニア性窒素の残存量は運転 57 日目までは減少したが、それ以降は $40 \text{ mgNH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下で残存し続けた。アンモニア性窒素の減少に伴い亜硝酸性窒素の蓄積も確認され始めたが、その量は $50 \text{ mgNO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下と RUN1 の半分程度であった。硝酸性窒素は多少変動しているものの平均で $170 \text{ mgNO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度で生成され続けていた。RUN3 ではアンモニア流入負荷を上げた直後に残存したアンモニア性窒素は即座に減少し、運転 66 日目までは硝酸性窒素の生成のみで完全硝化が進行した。運転 69 日目以降はアンモニア性窒素が $40 \text{ mgNH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度残存するようになり、それに伴い硝酸性窒素の生成量は $180 \text{ mgNO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ まで減少した。一方、亜硝酸性窒素の蓄積は本期間中を通して確認されなかった。Phase 3 終了時のスポンジ内の TS, VS (単位: $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ スポンジ体積) はそれぞれ 10.3, 9.17 (RUN1), 11.2, 10.2 (RUN2), 9.06, 8.44 (RUN3) であった。

d) Phase 4 (Day 82 - 124)

人工排水中の窒素源を $\text{NH}_4\text{-N}$ のみとし、平均 $1.98 \pm 0.06 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ で供給した本期間では、全系において顕著な亜硝酸性窒素の蓄積が確認された。RUN1 では $190 \text{ mgNH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度のアンモニア性窒素の残存と、 $220 \text{ mgNO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度の亜硝酸性窒素の蓄積が見られた。硝酸性窒素は減少傾向にあり、運転 98 日目では $11 \text{ mgNO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ であったが、その後は上限 $50 \text{ mgNO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度で増減を繰り返した。RUN2 ではアンモニア流入負荷を上げた直後、アンモニア性窒素と亜硝酸性窒素に大きな変動が見られたものの、運転 104 日目以降は比較的安定しており、それぞれ $230 \text{ mgNH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$, $160 \text{ mgNO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度であった。硝酸性窒素の変動についても運転 104 日目以降は安定しており、 $60 \text{ mgNO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度の生成量を維持していた。RUN3 ではアンモニア性窒素は増減を繰り返しながら増加傾向にあり、亜硝酸性窒素と硝酸性窒素に対しても大きな変動が見られた。最終的な各窒素化合物の濃度は $274 \text{ mgNH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$, $107 \text{ mgNO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$, $58 \text{ mgNO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。Phase 4 終了時のスポンジ内の TS, VS (単位: $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ スポンジ体積) はそれぞれ 12.3, 11.1 (RUN1), 11.9, 11.2 (RUN2), 12.5, 11.83 (RUN3) であった。

(2) 16SrRNA 遺伝子に基づいたスポンジバイオマス内の微生物群集の解析結果

運転 51 日目 (完全硝化時) と運転 124 日目 (亜硝酸型硝化の進行時) の各リアクター内のスポンジバイオマスに対して、Bacteria の 16SrRNA 遺伝子を標的としたクローン解析の結果およびアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸

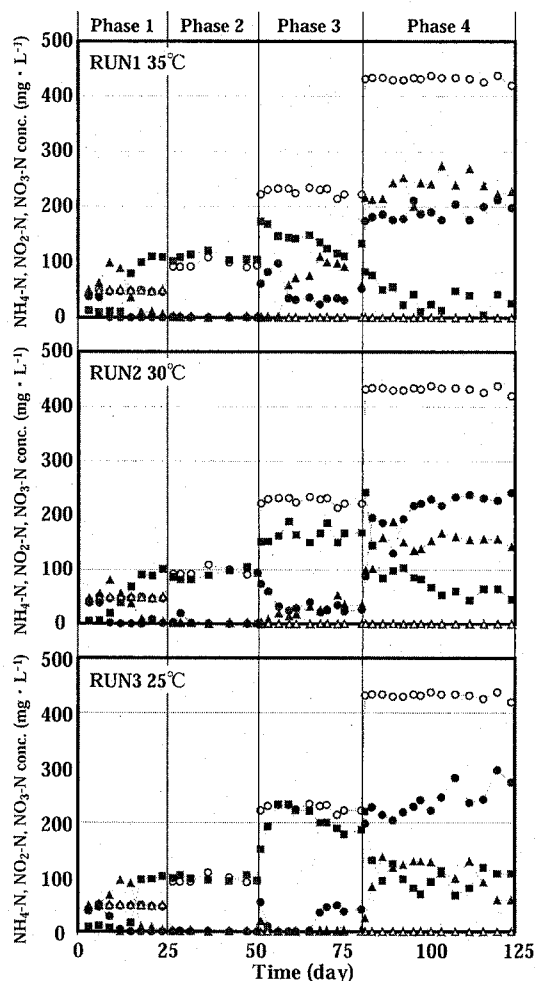


Figure 2. Time course of nitrogenous compound concentrations of three sponge airlift reactors during the phase 1 - 4. Symbols indicated as following; Influent $\text{NH}_4\text{-N}$ (○), Influent $\text{NO}_2\text{-N}$ (△), Effluent $\text{NH}_4\text{-N}$ (●), Effluent $\text{NO}_2\text{-N}$ (▲), Effluent $\text{NO}_3\text{-N}$ (■).

化細菌の系統樹を Figure 3, 4 に示した。運転 51 日目では全ての RUN において、亜硝酸酸化細菌の *Nitrospira* cluster 1 に属するクローン配列が最も高頻度に検出された (RUN1: D51R1-01[58%], RUN2: D51R2-05[44%], RUN3: D51R3-05[35%])。また RUN3 においては *Nitrobacter vulgaris* に近縁なクローン配列も検出された (D51R3-34[4%])。一方、アンモニア酸化細菌に属するクローン配列の検出頻度については RUN1 で 5%, RUN2 で 15%, RUN3 で 12% と亜硝酸酸化細菌に属するクローン配列と比べて低かった。これらのクローン配列 (D51R1-34,70, D51R2-04,50,56, D51R3-02,14,17) はいずれも *Nitrosomonas oligotropha* lineage または *Nitrosomonas marina* lineage に位置することから⁹⁾、この時期のリアクター内のアンモニア酸化細菌は、アンモ

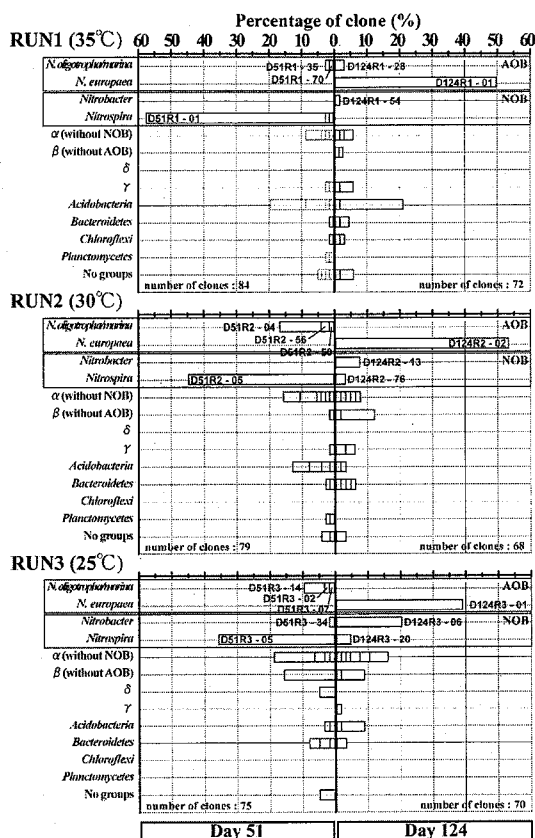


Figure 3. Comparison of 16SrRNA gene-based cloning results from the three reactors under complete nitrification (at day 51) and partial nitrification (at day 124) conditions.

ニアに対する基質親和性が高い（すなわち低濃度のアンモニア性窒素を好む）アンモニア酸化細菌であることが推測される¹⁰⁾。この時期は全ての RUN において完全硝化が進行しており、リアクター内のアンモニア性窒素濃度が低く保たれていたため、アンモニア酸化細菌の中でもこのような基質親和性の高いアンモニア酸化細菌が優占的に増殖したと考えられる。一方、亜硝酸型硝化が進行していた運転 124 日目のスポンジバイオマスに対するクローン解析の結果では全ての RUN において、アンモニアに対する基質親和性が低い（すなわち高濃度のアンモニア性窒素を好む）アンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas europaea* lineage に属するクローン配列が最も高頻度に検出された (RUN1:D124R1-01[50%], RUN2:D124R2-02[55%], RUN3:D124R3-01[38%])。また運転 51 日目に見られたような基質親和性が高いアンモニア酸化細菌に属するクローン配列は RUN1 からのみ検出された (D124R1-28)。この結果は残存するアンモニア性窒素の濃度により、優占するアンモニア酸化細菌

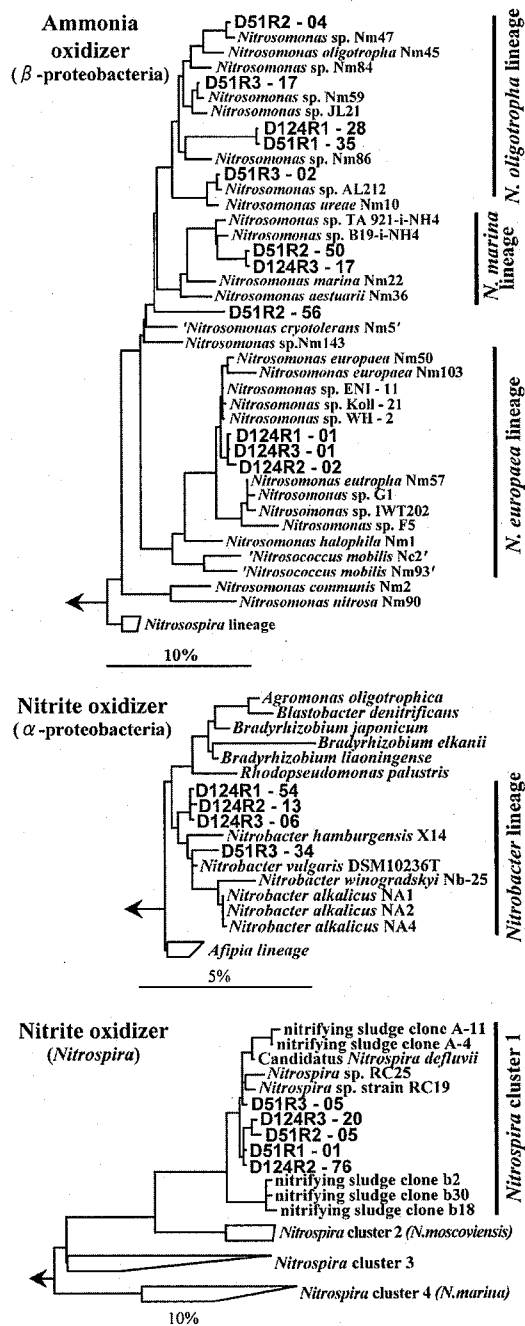


Figure 4. 16SrRNA gene-based phylogenetic trees of ammonia and nitrite oxidizers obtained from the sponge biomass in the reactor at operated under complete and partial nitrification conditions.

種は大きく変化することを意味しており、これまでに報告されている結果とも同様であった¹⁰⁾。一方の亜硝酸酸化細菌に属するクローン配列については、アンモニア酸化細菌に属するクローン配列と比べて検出頻度は低いも

の、全ての RUN から検出された。しかしながら、完全硝化時に高頻度に検出された *Nitrospira* cluster 1 に属するクローン配列は少なく (D124R2-76[4%], D124R3-20[5%]), *Nitrobacter* に属するクローン配列が高い頻度で検出された (RUN1:D124R1-54[2%], RUN2:D124R2-13[8%], RUN3:D124R3-06[20%])。

4. 考察

本研究ではスポンジ担体を充填したエアリフト型リアクターで、温度とアンモニア性窒素濃度が亜硝酸型硝化へ及ぼす影響を評価することを目的とし、35°C (RUN1), 30°C (RUN2), 25°C (RUN3) と温度条件の異なる3台のリアクターに対し、アンモニア流入負荷を段階的に上げて運転を行った。アンモニア流入負荷が $0.5 \text{ kgNH}_4^+\text{-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ (Phase2) 以下では温度に関係なく、全系において完全硝化反応が進行したが、 $1.0 \text{ kgNH}_4^+\text{-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ (Phase3) を越えるとアンモニア性窒素が流出水中に残存するようになり、それに伴い亜硝酸性窒素の蓄積も確認された。アンモニア流入負荷が $2.0 \text{ kgNH}_4^+\text{-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ (Phase4) を越えるとアンモニア性窒素の残存と亜硝酸性窒素の蓄積はより顕著に現れたが、これらの残存量、蓄積量は各 RUN で大きく異なり、運転温度が高いほど亜硝酸性窒素の蓄積量が増加する傾向が見られた。

Figure 5 に Phase3,4 における酸化されたアンモニア性窒素に占める亜硝酸性窒素の濃度比 ($\text{NO}_2\text{-N}/\text{NO}_x\text{-N}$) と残存のアンモニア性窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、または遊離アンモニア ($\text{NH}_3\text{-N}$) の濃度との関係図を示す。遊離アンモニアはアンモニア性窒素濃度、pH、温度の3要因から決まるもので、算出には次の Anthonisen らの計算式¹²⁾を用いた。

$$\text{NH}_3\text{-N}[\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}] = \frac{\text{NH}_4^+\text{-N}[\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}] \times 10^{\text{pH}}}{\exp(6344/(273 + T)) + 10^{\text{pH}}}$$

亜硝酸性窒素の濃度比と残存するアンモニア性窒素濃度の関係図からは、残存するアンモニア性窒素濃度、または運転温度が高いほど亜硝酸型硝化が進行しやすいことが見てとれた。しかしながら、もう一方の亜硝酸性窒素の濃度比と遊離アンモニア濃度の関係図からは、両者の間に比例関係に近い相関性が見られ、遊離アンモニア濃度が高くなるほど亜硝酸型硝化が進行しやすくなることが示された。RUN1 の Phase3 の3点 (遊離アンモニア濃度が $2 \sim 4 \text{ mgNH}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$ に対して、亜硝酸性窒素の濃度比がほぼ0である箇所) をはじめとする直線的な関係から外れている点は、いずれも運転条件を変更してから比較的早い時期に測定したものであり、リアクターが安

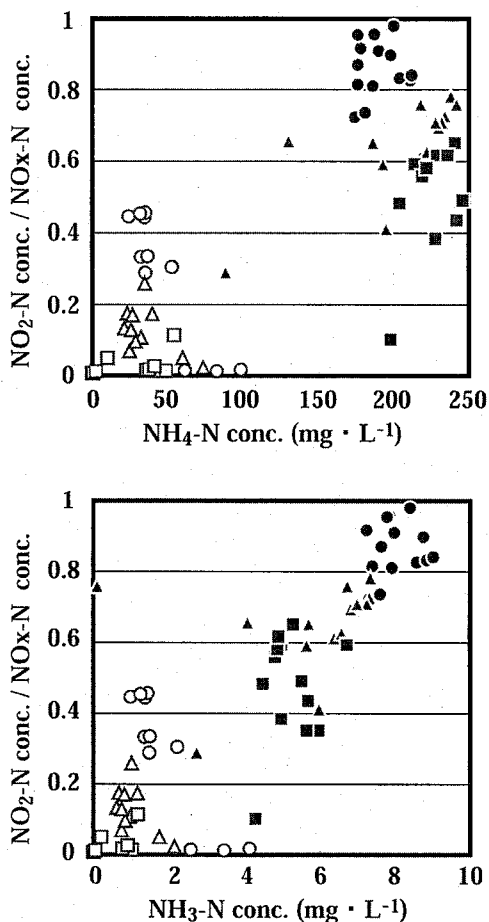


Figure 5. Effects of ammonium concentration or free ammonia concentration on ratio of nitrite accumulation during the phase 3 (white color) and 4 (black color). Symbols indicated as following: RUN1 (○, ●), RUN2 (△, ▲), RUN3 (□, ■).

定していなかったと考えられる。本実験における亜硝酸性窒素の蓄積は、遊離アンモニア濃度が $1 \text{ mgNH}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$ 付近から顕著に起こりだしたが、これは Anthonisen ら報告している亜硝酸酸化細菌が抑制され始める遊離アンモニア濃度 ($>0.1 \sim 1 \text{ mgNH}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$)¹²⁾ とほぼ一致していた。

これまでにも遊離アンモニア濃度が高くなると、亜硝酸型硝化が起こりやすくなるといった報告はあり、Bougard らはリアクターの運転温度を 30°C から 35°C に上げることで遊離アンモニア濃度が増加し、完全硝化から亜硝酸型硝化へ移行したと¹⁴⁾、Yun らはリアクターの立ち上げ時のアンモニア流入負荷を高くすることで、亜硝酸型硝化が進行することを報告している⁴⁾。また Gaul らの報告からも、遊離アンモニア濃度の増加に伴い亜硝酸性窒素の濃度比も増加する傾向は見られたが¹³⁾、本研

究のように直線的な関係は得られていない。この報告では、排水に汚泥消化槽の上澄み液を用いていたため、有機物による影響や流入負荷のばらつきがあったと考えられる。亜硝酸型硝化の制御は、DOを低く制御して亜硝酸酸化細菌が利用できる酸素量を制限することでも可能であり、Oyanedel-Craverらは生物膜を用いたエアリフト型リアクターで、バルク中のDOが $4\text{ mg-O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ 以下で亜硝酸型硝化の進行が観察されたことを報告している⁹⁾。本実験においてもスポンジ内の微生物の増殖より、完全硝化時と亜硝酸型硝化の進行時ではリアクター内のDOは減少したものの (Table 2, Phase2,4)、顕著な亜硝酸型硝化が観察されたDO ($<4\text{ mg-O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)⁹⁾よりも高く維持できていたことから、スポンジ表面におけるDOの影響はあまりないものと考えられる。

以上のことから、本研究のようなスポンジ担体を充填したエアリフト型リアクターを用いて亜硝酸型硝化を行う場合、温度またはアンモニア性窒素濃度を単独で調整するよりも、複合的に遊離アンモニア濃度を調整することが、一つの有効的な手段であることが強く示された。なお、pHによる遊離アンモニアの調整に関してはBaeらがバッチ試験より検証しており、pH 9までは良好な亜硝酸性窒素の蓄積が可能であると報告しているが¹⁰⁾、本研究では検証していないため今後明らかにする必要がある。

16SrRNA 遺伝子に基づいたクローン解析の結果からは、完全硝化時と亜硝酸型硝化の進行時では、リアクター内に存在するアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の種類は大きく変化することが明らかとなった (Figure 6)。残存するアンモニア性窒素濃度が増加するにつれて、リアクター内に優占するアンモニア酸化細菌は *Nitrosomonas oligotropha / marina* lineage に属するものから、*Nitrosomonas europaea* lineage に属するものへと移り変わった。この理由としては、前述 (3. 実験結果 (2)) したようにアンモニアに対する基質親和性の違いが主要因であると考えられる。亜硝酸酸化細菌の優占菌種も、完全硝化時に *Nitrospira* cluster 1 に属するものものから、亜硝酸型硝化の進行時には *Nitrobacter* に属するものへと移り変わった。この理由の一つとしては、*Nitrospira* が *Nitrobacter* よりも低い亜硝酸性窒素濃度を好むこと¹⁰⁾¹¹⁾が挙げられる。他にも遊離アンモニアに対する耐性の差も考えられるが、*Nitrospira* と *Nitrobacter* の遊離アンモニア耐性の比較を行った報告はないので、今後検証する必要がある。また完全硝化時と亜硝酸型硝化の進行時では、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の存在割合も大きく変化した。完全硝化時では *Nitrospira* に属する亜硝酸酸化細菌がアンモニア酸化細菌よりも高頻度に検出されたが、このことに対して

は明確な理由はまだ得られていない。一方で亜硝酸型硝化の進行時には、*Nitrosomonas europaea* に近縁なアンモニア酸化細菌が亜硝酸酸化細菌よりも高頻度に検出された。この理由としては前述したように、アンモニア酸化細菌が亜硝酸酸化細菌に比べ遊離アンモニアに対して強い耐性を持っていることが挙げられる。しかしながら、PCRを実験行程に含むクローン解析の検出頻度が、リアクター内の細菌の存在割合を必ずしも反映しているとは限らないので、FISH法を用いたセルカウントなどで定量的に評価する必要性はある。

5. まとめ

- 1) スポンジ担体を充填したエアリフト型リアクターによる亜硝酸型硝化の進行には、アンモニア流入負荷や温度よりも、これらの要因から複合的に生じる、遊離アンモニア濃度が強く影響しており、アンモニア流入負荷、温度、pHにより遊離アンモニア濃度を調整することが、亜硝酸型硝化を制御するうえで一つの有効な手段であることが示された。
- 2) 遊離アンモニア濃度が $8\text{ mg-NH}_3\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ 付近では、亜硝酸性窒素の濃度比は0.8となり、良好な亜硝酸型硝化の進行が確認された。
- 3) アンモニア酸化細菌の優占菌種は、完全硝化時では *Nitrosomonas oligotropha / marina* lineage に、亜硝酸型硝化の進行時には *Nitrosomonas europaea* lineage に属していることが示唆された。
- 4) 亜硝酸酸化細菌の優先菌種は、完全硝化時では *Nitrospira* cluster 1 に、亜硝酸型硝化の進行時には *Nitrobacter* に属していることが示唆された。

遊離アンモニアで亜硝酸型硝化の制御が可能であることが示されたが、今後はpHやDOといったパラメータにも着目して複合的な制御に取り組むと共に、分子生物学的手法により亜硝酸型硝化に影響を及ぼす微生物群を定性・定量的に評価する予定である。最終的には立ち上げ時の最適な運転条件や、一般的に困難とされている低温条件下での亜硝酸型硝化の制御、より確実な制御を行うために亜硝酸型硝化が可能な各種パラメータ範囲の提唱を考えている。

謝辞：本研究はNEDO（新エネルギー産業技術総合開発機構）及び文部科学省科学研究費の助成を受けた。ここに記して、感謝します。

参考文献

- 1) 徳富孝明: anammox プロセス実用化の展望, 水環境学会誌, Vol.27, No.7, pp.453-456, 2004.
- 2) Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., Van Loosdrecht, M.C.M.A., and Heijnen, J.J.: The SHARONprocess: An innovative method for nitrogen removal from ammonium rich wastewater, *Water Sci. Technol.*, Vol.34, No.9, pp.135-142, 1998.
- 3) Jianlong, W., and Ning, Y.: Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions, *Process. Biochem.*, Vol. 39, pp.1223-1229, 2004.
- 4) Yun, H.J., and Kim, D.J.: Nitrite accumulation characteristics of high strength ammonia wastewater in an autotrophic nitrifying biofilm reactor, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Vol. 78, pp. 377-383, 2003
- 5) Fernández, B., Vilar, A., Ben, M., Kennes, C., and Veiga, M.C.: Partial nitrification of wastewater from an aminoplastic resin producing factory, *Water Sci. Technol.*, Vol.52, No.10-11, pp.517-524, 2005.
- 6) Third, K.A., Sliekers, A.O., Kuenen, J.G., and Jetten, M.S.M.: The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under Ammonium Limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria, *Sys. Appl. Microbiol.*, Vol.24, pp. 588-596, 2001.
- 7) Pynaert, K., Sprengers, R., Laenen, J., and Verstraete, W.: Oxygen-limited nitrification and denitrification a lab-scale rotating biological contactor, *Environ. Technol.*, Vol. 23, pp. 353-362, 2002.
- 8) Oyanedel-Craver, V., Ruiz, G., and Chamy, R.: Nitrite accumulation in activated sludge and airlift reactors: Process performance comparison, *Environ. Eng. Sci.*, Vol.22, No.4, pp.450-458, 2005.
- 9) Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A., and Koops, H.P.: 16SrRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Vol.53, pp.1485-1494, 2003.
- 10) Koops, H.P., and Pommerening-Röser, A.: Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species, *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol.37, pp.1-9, 2001.
- 11) 金田一智規, 伊藤司, 岡部聡, 渡辺義公: 16SrDNA 解析によるアンモニア酸化細菌の多様性評価, 環境工学研究論文集, Vol.40, pp.71-79, 2003.
- 12) Anthonissen, A.C., Loehr, R.C., Praksam, T.B.S., and Srinath, E.G.: Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.*, Vol.48, pp.835-852, 1976.
- 13) Gaul, T., Märker, S., and Kunst, S.: Start-up of moving bed biofilm reactors for deammonification: the role of hydraulic retention time, alkalinity and oxygen supply, *Water Sci. Technol.*, Vol.52, No.7, pp.127-133, 2005.
- 14) Bougard, D., Bernet, N., Chénry, D., and Delgenes, J.-P.: Nitrification of high-strength wastewater in an inverse turbulent bed reactor: Effect of temperature on nitrite accumulation, *Process. Biochem.*, Vol. 41, pp.106-113, 2006.
- 15) Bae, W., Baek, S., Chung, J., and Lee, Y.: Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors, *Biodegradation*, Vol.12, pp.359-366, 2001.
- 16) Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.-H., and Wagner, M.: In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.67 (3-12), pp.5273-5284, 2001.
- 17) Schramm, A., De Beer, D., Van Den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., and Amann, R.: Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. Along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsenors, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.65 (8), pp.3690-3696, 1999.

(2006. 5. 26 受付)

Effects of Temperature and Ammonium Concentration on Partial Nitrification in Sponge-Airlift Reactor

Kenichi ABE¹, Akiyoshi OHASHI¹, Hiroyuki IMACHI², Hideki HARADA³,
Takaaki TOKUTOMI⁴

¹Dept. of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology

²Extremobiosphere Research Center, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
(JAMSTEC)

³Dept. of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

⁴Kurita Water Industries LTD.

Three airlift reactors with sponge-carriers were operated by a stepwise increase of ammonium loading rate at different temperatures, 25, 30, 35°C, to investigate effects of temperature and ammonium concentration on partial nitrification to nitrite. A high ammonium loading rate (1 kg $\text{NH}_4^+\text{-N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$) caused nitrite accumulation accompanied with remaining ammonium. The ratio of nitrite accumulation to ammonium oxidation strongly correlated with free ammonia more than ammonium concentration or temperature. The free ammonia concentration of 8 mg $\text{NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ allowed the almost occurrence of partial nitrification having the ratio of 0.8. The result suggests free ammonia must be a crucial factor to control partial nitrification. Cloning results of sludge samples showed *Nitrospira* genus of nitrite-oxidizing bacteria was a predominant microorganism under the complete nitrification condition, while ammonia-oxidizing bacteria predominated under the partial nitrification condition.