

(24) 塩分濃度による亜硝酸型硝化の誘導効果の有無

阿部 憲一^{1*}・大橋 晶良^{1,2}・山口 隆司¹・徳富 孝明³

¹長岡技術科学大学 大学院工学研究科 環境・建設系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

²広島大学 大学院工学研究科 社会環境システム専攻 (〒739-8527 広島県東広島市鏡山1丁目4番1号)

³栗田工業株式会社 (〒329-0105 栃木県下都賀郡野木町川田五丁目1-1)

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

塩分濃度は亜硝酸型硝化に影響を及ぼす主要な環境因子の一つであるが、その効果については賛否両論がある。本研究においては、担体を充填したエアリフト型リアクターに人工廃水中のNaCl濃度を段階的に上げて供給したところ、NaCl濃度が $16 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ に達しても NO_2^- 蓄積は確認されなかった。同NaCl濃度条件下で NH_4^+ 濃度を上げたところ部分的な NO_2^- 蓄積が起こり、本リアクターは亜硝酸型硝化のポテンシャルを持つことが示された。以上のことから、塩分濃度に亜硝酸型硝化の誘導効果は無いことが判明した。NaCl添加の前後でも、リアクター内のアンモニア酸化細菌 (*Nitrosomonas europaea*) および亜硝酸酸化細菌 (*Nitrobacter* spp., *Nitrospira* spp.) の種類は大きく変化しなかった。

Key Words : Airlift reactor, Ammonia-oxidizing bacteria, Nitrite-oxidizing bacteria, Partial nitrification, Salt inhibition

1. はじめに

亜硝酸型硝化と嫌氣的アンモニア酸化 (Anammox) を組み合わせた窒素除去プロセスは、現行の硝化脱窒プロセスに比べて運転コストの大幅な削減が期待できるため、実用化に向けた研究が精力的に行われている。このプロセスの最重要課題の一つとして挙げられる「亜硝酸型硝化の制御方法の確立」については、温度、pH、溶存酸素 (DO) 濃度、基質濃度 (主として NH_4^+)、そして塩分濃度が主要な影響因子として知られており¹⁾、これらの因子を用いて亜硝酸型硝化の制御を可能にしたプロセスとして Single reactor High activity Ammonia Removal over Nitrite (Sharon), Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite (Canon), Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification (Oland) が開発されている²⁾。Sharon²⁾は温度、pH、 NH_4^+ 濃度の調節によりアンモニア酸化細菌 (AOB) と亜硝酸酸化細菌 (NOB) の増殖速度差を生み出し、NOBのみをリアクターからウォッシュアウトさせることで亜硝酸型硝化を可能にしたプロセスである。既にオランダを中心に実規模プラントが稼働しており³⁾、Anammox と組み合わせた Sharon/Anammox プロセスとしての利用も期待されている。一方のCanon³⁾やOland⁴⁾は、AOBがNOBより酸素に対する親和性が高いことに着目し⁵⁾、低DO濃度環境下において

亜硝酸型硝化を可能にしたプロセスである。

このように各因子と亜硝酸型硝化との関係が明らかになる一方で、塩分濃度についてはその効果の有無に対して議論がなされている。Yuらは海水を35% (約 $7 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$) 添加することで、またCuiらはNaCl濃度が $6 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上でそれぞれ亜硝酸型硝化が進行した ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_x$ 比 >0.9) と報告している^{7,8)}。これに反して、Camposらは塩分濃度が $18 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上でも完全硝化が進行したと報告している⁹⁾。これらと同様に、AOBとNOBに塩分耐性に関しても賛否両論の報告がある^{10,12)}。

塩分濃度の効果に対して大きな食い違いがある理由の一つとして、これまでの報告の多くが回分試験や連続式回分反応器 (SBR) によるものであることが考えられる。これらの装置では短時間に、pHやDO濃度、基質濃度が大きく変動するため、塩分濃度のみの影響を評価することが困難であることは容易に想像できる。

亜硝酸型硝化の制御方法の確立には、前述した各因子が亜硝酸型硝化に及ぼす影響を明らかにする必要がある。そこで本研究では、完全混合式のエアリフト型リアクターを用いて基質 (人工廃水) の連続供給を行うことで他の因子の変動を制御し、塩分濃度による亜硝酸型硝化の誘導効果の有無を検証した。また分子生物学的手法により、塩分濃度によるAOB、NOBの変遷を調査した。

2. 実験方法

(1) 実験装置および運転条件

実験装置には有効容積 3L のエアリフト型リアクターを用い (Figure 1), 下水処理場の返送汚泥を植種したスポンジ担体 (ポリウレタン製, $3 \times 3 \times 3$ mm) を有効容積の 30% で充填した。運転温度は 35°C (RUN1) と 25°C (RUN2) に定め, 2 台のリアクターを用いて同時進行で実験を行った。pH は pH コントローラー (mk-250Tubing Pump, ASR) による自動制御で $\text{pH } 7.5 \pm 0.1$ とし (1N NaOH を使用), DO 濃度は $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ に調整した。

供給廃水は硫酸アンモニウムを窒素源とした無機人工廃水を用い, 塩分濃度は NaCl を添加して調整した (Table 1)。本実験は塩濃度を段階的に上げた Phase 1-4 と, アンモニウム流入負荷 (ALR) を変動させた Phase 5-8 の 8 つの Phase で構成されている。塩分濃度は NaCl の添加で, ALR は硫酸アンモニウムの添加で調整し, HRT は全 Phase とも 5 時間で一定とした。Table 2 に各 Phase におけるアンモニウム性窒素および NaCl 濃度, ALR と DO 濃度の平均値を示した。なお, 本リアクターのスタートアップは, 同一の装置で 280 日程度運転したスポンジ担体を用いており,

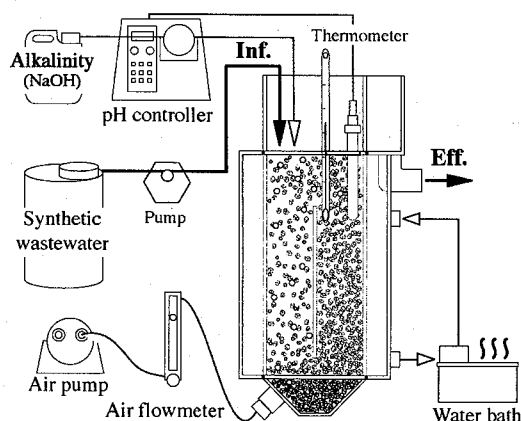


Figure 1. Schematic diagram of the airlift reactor used in this study

130 日間ほど Phase 1 と同条件で安定した完全硝化が進行していたものである。

(2) 水質分析

リアクター流入水中のアンモニウム性窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$), 流出水中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$, 亜硝酸性窒素 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$), 硝酸性窒素 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) の各濃度は, 比色測定法 (DR2000, HACH) により測定した。温度は棒状温度計で, pH は pH コントローラーによるオンサイトでの測定を行い, 全実験期間を通して初期設定値を維持していたことを確認した。DO 濃度はポータブル DO 計 (DO-5509, カスタム) を用い, 1 日 1 回測定した。

(3) 16S rRNA 遺伝子に基づいた微生物群集の解析

Phase 1 終了時 (NaCl 濃度 $0 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$) と Phase 4 終了時 (NaCl 濃度 $16 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$) の担体内バイオマスに対してクローン解析を行った。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 と UNIV1500R のプライマーセットを用いて, Bacteria の 16S rRNA 遺伝子領域を特異的に増幅した。得られた PCR 産物を TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) によってクローン化し, 無作為選択で回収した。各サンプルでそれぞれ 45 クローン程度の塩基配列を解読してグループ分けを行い, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の BLAST search を用いて近縁種を特定した。

Table 1. Composition and concentration of the synthetic wastewater

Components	Final conc.	Components	Final conc.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.07 - 4.28 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.43 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.99 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
KH_2PO_4	0.11 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.22 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
EDTA · 2Na	7.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.19 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
		Na_2SeO_4	1.08 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
NaCl	0 - 26.3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	H_3BO_3	0.14 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Table 2. Operating condition applied to the reactors

Phase	Day	Nitrogen source ($\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$)	NaCl concentration ($\text{gCl} \cdot \text{L}^{-1}$)	ALR ^a ($\text{g} \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) ^b		Dissolved oxygen conc. ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ^b	
				RUN1_35°C	RUN2_25°C	RUN1_35°C	RUN2_25°C
1	0 - 22	$\text{NH}_4^+ : 225$	0	1.05	1.08	4.6	4.8
2	23 - 36	$\text{NH}_4^+ : 225$	5.3 (150 mM)	1.07	1.08	4.2	4.2
3	37 - 51	$\text{NH}_4^+ : 225$	10.6 (300 mM)	1.07	1.07	4.7	4.6
4	52 - 65	$\text{NH}_4^+ : 225$	16 (450 mM)	1.05	1.09	4.2	4.5
5	66 - 80	$\text{NH}_4^+ : 450$	16	2.17	2.21	4.4	4.5
6	81 - 94	$\text{NH}_4^+ : 225$	16	1.08	1.09	4.6	4.6
7	95 - 113	$\text{NH}_4^+ : 900$	16	4.47	4.47	4.6	4.5
8	114 - 123	$\text{NH}_4^+ : 225$	16	1.10	1.06	4.6	4.7

^a ALR: Ammonium Loading Rate

^b Average in each phase.

3. 実験結果および考察

(1) 塩分濃度による亜硝酸型硝化の誘導効果の有無

Figure 2に塩分濃度とアンモニウム流入負荷を変えて運転を行ったRUN1 (35°C) およびRUN2 (25°C) の、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- (単位: $\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$) の経日変化を示した。本リアクターは前述の通り完全混合式であるため、リアクター内と流出水の水質は同じである。

NaCl を添加する前 (Phase 1) はRUN1, 2ともに、残存する NH_4^+ に差はあるものの (RUN1: $< 20 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, RUN2: $60\text{--}100 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$)、 NO_2^- の蓄積はほとんど無く (RUN1: $< 35 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, RUN2: $< 40 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$)、完全硝化が進行していた。Phase 2から4にかけて、 NaCl 濃度を段階的に増やして運転したところ (最終濃度: $16 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$)、残存する NH_4^+ 濃度に増加傾向が見られた (RUN1: $35\text{--}55 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, RUN2: $100\text{--}135 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, Phase 4にて)。これは NaCl 濃度の増加により、AOBの活性または存在数が低下したためだと考えられる。しかしながら、この期間においても NO_2^- の蓄積はほとんど確認されず (RUN1: $< 6 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, RUN2: $< 10 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$)、完全硝化が進行し続けた。これらの結果より、塩分濃度では亜硝酸型硝化は誘導されないことが示唆された。

Phase 5から8にかけては、本リアクターの亜硝酸型硝化

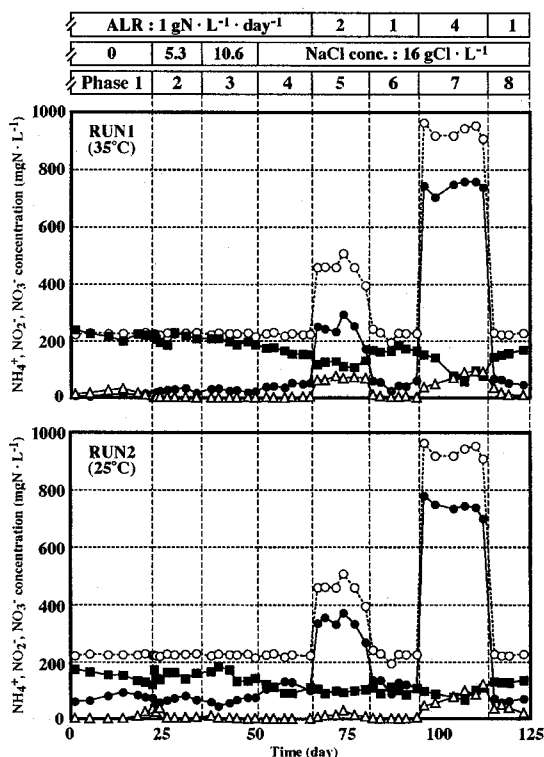


Figure 2. Time course of nitrogenous compound concentrations of the airlift reactors during the experiment. Symbols indicated as following: Influent NH_4^+ : ○, Effluent NH_4^+ : ●, Effluent NO_2^- : △, Effluent NO_3^- : ■.

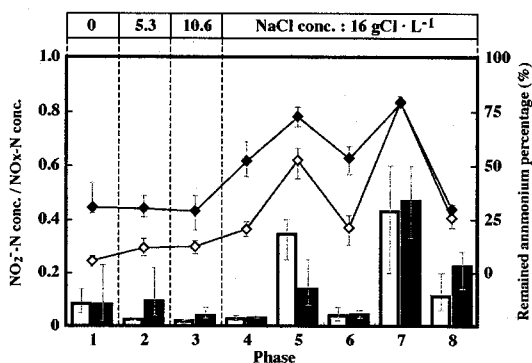


Figure 3. Nitrite accumulation ratio and remained ammonium percentage (RAP) in each phase of the experiments. Bars indicates $\text{NO}_2^- / \text{NO}_x$ ratios of RUN1 (White) and RUN2 (Black). Symbols of ◇ and ◆ are RAPs of RUN1 and RUN2.

ポテンシャルを確認するために、ALRを変動させた運転を行い、既報よりその効果が知られている NH_4^+ (NH_3) 濃度による亜硝酸型硝化の誘導を試みた^[3,14]。その結果、RUN1はALRを上げたPhase 5, 7にて、RUN2はPhase 7にて残存する NH_4^+ 濃度の増加に伴い、顕著な (Phase 1-4間よりも高い NO_2^- 濃度での) NO_2^- 蓄積が確認された。この結果は、本リアクターが亜硝酸型硝化のポテンシャルを持っていたことを示している。また、ALRを下げたPhase 6, 8では、 NO_2^- 濃度も速やかに減少しており、亜硝酸型硝化は NH_4^+ 濃度の増減に対して素早く応答することが示された。

以上の結果より、スポンジ担体を充填したエアリフト型リアクターに対して NaCl 濃度とALRを変動させた連続運転を行った本研究では、塩分濃度による亜硝酸型硝化の誘導効果はないことが明らかとなった。

Figure 3にRUN1, 2の各Phaseにおける NO_2^- 濃度比 ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_x$) と、流入 NH_4^+ 濃度に対する残存 NH_4^+ 濃度の割合を示した。このグラフからはRUN1, 2ともに NaCl 濃度の上昇に伴い、 NO_2^- 濃度比も減少傾向にあることが見てとれる (Phase 1-4)。この結果より、AOBはNOBよりも塩分濃度による阻害を受けやすく、塩分濃度の増加が亜硝酸型硝化に対して抑制的な影響を及ぼしている可能性が考えられるが、これに関しては更なる検証実験が必要である。AOBとNOBの塩分阻害に関しては、Hunikらは*Nitrosomonas europaea*と*Nitrobacter agilis* (現 *N. winogradsky*) について^[10, 11]、またMoussaらは順養した活性汚泥について調査しており^[15]、共にAOBの方がNOBより敏感に塩分濃度の影響を受けると報告している。

運転温度の違いについては、Phase 1から6にかけてはRUN1 (35°C) がRUN2 (25°C) に比べ、残存する NH_4^+ 濃度の割合が少ないことが見てとれる。その一方で、ALRが最も高いPhase 7では、RUN1, 2の間に残存 NH_4^+ の割合の差は見られなくなった。これは NH_4^+ 濃度が高くなると、温度から NH_4^+ 濃度へと支配因子が変わることを示唆している。ま

Table 3. Detection frequency and closest relatives of the AOB and NOB-like clones under different salinity and temperature in the reactors

Clone	Closest related species (Accession No.)	Similarity (%)	Percentage of total clones (%)			
			Day 20 (0 gCl·L ⁻¹)		Day 65 (16 gCl·L ⁻¹)	
			RUN1_35°C	RUN2_25°C	RUN1_35°C	RUN2_25°C
NSOM-1	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC19718 (BX321856)	99	11	11	6	25
NBAC-1	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255 (CP000115)	99	-	-	9	2
NBAC-2	<i>Nitrobacter vulgaris</i> DSM10236T (AM114522)	98	-	2	2	7
NSPI-1	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (DQ059545)	92	27	-	25	-
NSPI-2	<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i> (DQ059545)	98	9	15	2	14

た、遊離アンモニア (NH₃) の影響も考えられるが¹⁹, その影響の度合いや濃度については既報中に差があること¹⁴¹⁶⁻¹⁸, また本論文の主旨と逸れることから紹介にとどめる。

(2) 塩分濃度による AOB および NOB の変遷

Phase 1 終了時 (NaCl 濃度 0 gCl·L⁻¹) と Phase 4 終了時 (NaCl 濃度 16 gCl·L⁻¹) の担体内バイオマスに対して行ったクローン解析で検出された, AOB, NOB に属するクローンの近縁種と相同性および検出頻度を Table 3 に示した。

本リアクター内における AOB は全サンプルを通して 1 種類のみであり, *Nitrosomonas europaea* に近縁なクローンであった (NSOM-1)。一方の NOB は *Nitrobacter* に属するクローンが 2 種類 (NBAC-1, 2), *Nitrospira* に属するクローンが 2 種類検出された (NSPI-1, 2)。本リアクターは以前に高 ALR で運転されており, その際に高 NH₄⁺ 濃度を好む *Neuropaea* に近縁な AOB が選択的に増殖し, それ以降 NSOM-1 (検出頻度 6-25%) のみが優占化している。なお *Neuropaea* の塩分耐性は 400 mM NaCl (14 gCl·L⁻¹) と報告されており¹⁹, これは本実験における Phase 3 (10 gCl·L⁻¹) から Phase 4 (16 gCl·L⁻¹) に見られたアンモニア酸化率の減少と一致している (Figure 3)。

NOB については *Nitrospira* に属するクローンが高頻度に検出されたが, 運転温度の違いにより優占種は明確に分かれており, RUN1 では NSPI-1 が NSPI-2 より高頻度に, また RUN2 では NSPI-2 のみが検出された。NSPI-1, 2 の近縁種はともに *Candidatus Nitrospira defluvii*²⁰ であったが, NSPI-1 と *C.N. defluvii* を含む既知の *Nitrospira* との相同性は 92% 以下であることから, NSPI-1 は種レベル以上で新規な *Nitrospira* であると考えられる。*Nitrobacter* に属するクローンについても同様に, 運転温度による優占種の違いが見られた (RUN1: NBAC-1, RUN2: NBAC-2)。なお, リアクター内の NaCl 濃度が高くなると, *Nitrobacter* に属するクローンの検出頻度が高くなる傾向が見られたことから, *Nitrospira* よりも *Nitrobacter* に属する NOB の方が塩分耐性が高いことが示唆された。しかしながら, AOB に比べ NOB の塩分耐性の関する報告は乏しいので^{19, 20}, 今後はそれぞれ単独 (純粋菌株) での塩分耐性についての調査を行い, 見識を深める必要があると考えられる。また, 塩分濃度の変化に

よる AOB, NOB の増減を評価するには, クローン数のみでは信頼性が低いため, Real-time PCR など で定量的に評価する必要もある。

(3) 塩分濃度に関する既報との比較

前述の通り, 本実験では NaCl 濃度が 16 gCl·L⁻¹ に達しても亜硝酸型硝化の進行は全く確認されず, 塩分濃度による亜硝酸型硝化の誘導効果は無いという結果が得られた (3. 実験結果および考察 (1))。一方で, Yu や Cui らは塩分濃度を 6-7 gCl·L⁻¹ 程度まで上昇させることで, ほぼ完全な亜硝酸型硝化を達成したと報告している^{7, 8}。このような相反する結果が存在する理由の一つとして, 実験装置および運転方法の違いが考えられる。

Table 4 に塩分濃度と NO₂ 蓄積 (=亜硝酸型硝化) に関する既報の一覧および本実験結果を示した。この表より, 回分式装置 (batch, SBR) の方が連続式装置 (ASU, FBR, SAR) よりも, NO₂ 濃度比が高い傾向にあることが見て取られる。SBR は廃水供給, 曝気処理, 汚泥の沈降, 処理水の引き抜きを 1 サイクルとした運転方法であるため, リアクター内では短時間に基質 (特に NH₄⁺) 濃度や DO 濃度の変動する。これら亜硝酸型硝化の主要な影響因子の変動は, 基質供給時の NH₄⁺ (NH₃) 濃度の急激な増加や (高 NH₄⁺ 濃度環境), 汚泥沈降のための無曝気時における DO 濃度の低下 (低 DO 濃度環境) など引き起こし, NOB を選択的に抑制していた可能性が考えられる^{6, 10}。ここに塩分濃度の増加による DO の溶け込み量の減少や¹⁵, AOB が塩分阻害を受けることでの NH₄⁺ 消費速度の減少などが, 上記の NOB を抑制する環境をより強固にしたことで亜硝酸型硝化が進行したと推察される。本研究では塩分濃度が亜硝酸型硝化に及ぼす直接的な影響のみに焦点を置いているが, 上記のように塩分濃度が他の因子 (DO, NH₄⁺ 濃度など) の変動を誘導し, その結果として亜硝酸型硝化が引き起こされる間接的な影響についても見識を深める必要がある。以上のことから, 塩分濃度の影響を評価する際には, NH₄⁺ や DO 濃度の把握が必要不可欠である。したがって, NH₄⁺ や DO 濃度の記載がない Cui ら⁸, Chen ら²³, Intrasingkla ら²⁹, Dincer ら²⁴ の報告については, 亜硝酸型硝化の主要因が塩分濃度であるかどうかは言及できない。

Table 4. Nitritation ratios under different salinity and other operating conditions of reported results and this study

NO ₂ /NO _x ratio	Salt (gCl·L ⁻¹)	Reactor type ^a	Seed ^b	Medium ^c	Temp. (°C)	pH	DO (mg·L ⁻¹)	Inf. NH ₄ ⁺ (mgN·L ⁻¹)	Eff. NH ₄ ⁺ (mgN·L ⁻¹)	Eff. NO ₂ ⁻ (mgN·L ⁻¹)	Eff. NO ₃ ⁻ (mgN·L ⁻¹)	Refs.
0.95	6.8 (35% seawater)	SBR	DA	DW	25-28	7.5-8.0	3-4	40-70	< 5	11-17	< 1	Yu et al. 7)
0.9	6 (NaCl)	SBR	EDA 60 days	UW	NI ^d	7.2-7.7	NI	32-85	12-26	12-32	< 4	Cui et al. 8)
NO ₂ conc. increased	10-30 (NaCl)	Batch (SBR)	EDA over 60 d	SW	20±1	7.7-8.2	> 6	100	NI	10-25	NI	Chen et al. 22)
0.5-0.7	1.2 (NaCl)	SBR	NA	SW	20-22	NI	NI	50	< 5	6-14	3-7	Intrasungkha et al. 23)
0.02, 0.14	12, 30 (NaCl)	ASU	MC	SW	NI	7.5	NI	100	2, 25	90, 60	2, 10	Dinçer et al. 24)
0.5-0.7	around 30	FBR Ash carriers	NA	FGDW	30±4	7-8	1-6	100-310	< 50	80-120	40-60	Vredenburg et al. 25)
0.45, 0.17	20, 25	FBR No carriers	NA	FGDW	30±4	7-8	8-10	30-40	< 5, 20-30	35, 10	40, 50	
Almost 0	18 (NH ₄ Cl+NaCl)	ASU	EC	SW	20	7.8	> 2	3.2 (gN·L ⁻¹)	Almost 0 (gN·L ⁻¹)	Almost 0 (gN·L ⁻¹)	3.1 (gN·L ⁻¹)	Campos et al. 9)
0.03 (phase 4)	16 (NaCl)	SAR	EDA 280 d	SW	35 25	7.5	4-5	220-230	40-55 100-135	3-6 3-6	160-180 95-130	This study

^a SBR: Sequence batch reactor; ASU: Activated sludge unit; FBR: Fluid bed reactor; SAR: Filled sponge airlift reactor.

^b DA: Domestic activated sludge; EDA: Enriched DA; NA: Nitrifying activated sludge; MC: Mixed culture of Nitrosomonas and Nitrobacter; EC: Enriched culture of nitrifying bacteria

^c DW: Domestic wastewater; UW: University wastewater; SW: Synthetic wastewater; FGDW: Flue gas desulphurisation wastewater

^d NI: Not identified

一方の本研究では、エアリフト型リアクターを用いて廃水を連続的に供給する運転方法を選択したため、NH₄⁺やDO濃度を固定条件として制御した上で実験を行うことができた。このことより、SBRを用いた既報よりも本実験結果の方が、亜硝酸型硝化に及ぼす塩分濃度の影響を正確に表現していると考えられる。活性汚泥システムによる高塩・高アンモニア含有廃水の処理特性を調査したCamposらの結果と同じ傾向にあり、彼らは塩分濃度 18 gCl · L⁻¹ においてもNO₂⁻の蓄積が起こらず、完全硝化が進行したと報告している⁹⁾。またVredenburgらの報告では²⁹⁾、DO濃度を高く維持した系 (No carriers) において、塩分濃度の増加に伴い、流出NH₄⁺濃度の増加とNO₂⁻濃度比の減少が見られている。この結果は本実験結果と同様に、塩分濃度による亜硝酸型硝化の抑制的影響がある可能性を示すものと考えられる。

4. まとめ

本実験では、スポンジ担体を充填したエアリフト型リアクターに無機人工廃水を供給した連続実験を行い、NaCl濃度とALRを変動させて、塩分濃度による亜硝酸型硝化の誘導効果の有無を検証した。また、16S rRNA遺伝子を標的としたクローン解析により、塩分濃度の増加とAOB, NOBの変遷を追跡したところ、以下の知見が得ることができた。

(1) NaCl濃度が海水と同程度の16 gCl · L⁻¹ に達してもNO₂⁻の蓄積は見られず完全硝化が進行したことから、塩分濃

度による亜硝酸型硝化の誘導効果は無いことが判明した。
(2) 本リアクター内で優占しているAOBは*Nitrosomonas europaea*の近縁種であり、温度やNaCl濃度に関わらず同一种であることが示された。
(3) 本リアクター内には*Nitrobacter*および*Nitrospira*に属するNOBの存在が確認され、同属においても温度により優占種が異なることが示された。またNaCl濃度の増加に伴い*Nitrobacter*に属するクローンの検出頻度が増えたことから、NOBの塩分耐性は*Nitrospira*より*Nitrobacter*の方が高いことが示唆された。

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、感謝いたします。

参考文献

- 1) Paredes, D., Kuschik, P., Mbwette, T.S.A., Stange, F., Müller, R.A., Köser, H.: New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment - A review, *Eng. Life Sci.*, Vol. 1, No. 7, pp. 13-15, 2007.
- 2) Hellings, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J.: The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 37, No. 9, pp. 135-142, 1998.
- 3) Third, K.A., Slikkers, A.O., Kuennen, J.G., Jetten, M.S.M.: The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria, *System. Appl. Microbiol.*, Vol. 24, No. 4, pp. 588-596, 2001.

- 4) Kuai, L., and Verstraete, W.: Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, No. 11, pp. 4500-4506, 1998.
- 5) van Loosdrecht, M.C.M., Salem, S.: Biological treatment of sludge digester liquids, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 53, No. 12, pp. 11-20, 2006.
- 6) Wiesmann, U.: Biological nitrogen removal from wastewater, *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, Vol. 51, pp. 113-151, 1994.
- 7) Yu, D.-S., Peng, Y.-Z., Zhang, K.: Effects of seawater salinity on nitrite accumulation in short-range nitrification to nitrite as end product, *J. Environ. Sci.*, Vol. 16, No. 2, pp. 247-251, 2004.
- 8) Cui, Y.W., Peng, Y.Z., Peng, C.Y., Gan, X.Q., Ye, L.: Achieving biological nitrogen removal via nitrite by salt inhibition, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 53, No. 6, pp. 115-122, 2006.
- 9) Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Sánchez, M., Méndez, R., Lema, J.M.: Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit, *Wat. Res.*, Vol. 36, No. 10, pp. 2555-2560, 2002.
- 10) Hunik, J.H., Meijer, H.J.G., Tramper, J.: Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at extreme substrate, product and salt concentration, *Appl. Microbiol. Biotech.*, Vol. 37, No. 6, pp. 802-807, 1992.
- 11) Hunik, J.H., Meijer, H.J.G., Tramper, J.: Kinetics of *Nitrobacter agilis* at extreme substrate, product and salt concentrations, *Appl. Microbiol. Biotech.*, Vol. 40, No. 2-3, pp. 442-448, 1993.
- 12) Sánchez, O., Aspé, E., Martí, M.C., Roeckel, M.: The effect of sodium chloride on the two-step kinetics of the nitrifying process, *Wat. Environ. Res.*, Vol. 76, No. 1, pp. 73-80, 2004.
- 13) Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Sinath, E.G.: Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, *J. Wat. Pollut. Cont. Fed.*, Vol. 48, No. 5, pp. 835-852, 1976.
- 14) 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, No. 4, pp. 377-383, 2003.
- 15) Moussa, M.S., Sumanasekera, D.U., Ibrahim, S.H., Lubberding, H.J., Hooijmans, C.M., Gijzen, H.J., Van Loosdrecht, M.C.M.: Long term effects of salt on activity, population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers, *Wat. Res.*, Vol. 40, No. 7, pp. 1377-1388, 2006.
- 16) Simm, R.A., Mavinic, D.S., Ramey, W.D.: A targeted study on possible free ammonia inhibition of *Nitrospira*, *J. Environ. Eng. Sci.*, Vol. 5, No. 5, pp. 365-376, 2006.
- 17) Vadivelu, V.M., Keller, J., Yuan, Z.: Effect of free ammonia on the respiration and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture, *Wat. Res.*, Vol. 41, No. 4, pp. 826-834, 2007.
- 18) Fernández, A., Vilar, A., Ben, M., Kennes, C., Veiga, M.C.: Partial nitrification of wastewater from an aminoplastic resin producing factory, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 52, No. 10-11, pp. 517-524, 2005.
- 19) Koops, H.-P., Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Timmermann, G., Wagner, M.: The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria, *The Prokaryotes: An evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, third edition, Springer-Verlag, New York, 2003.
- 20) Spieck, E., Hartwig, C., McCormack, I., Maixner, F., Wagner, M., Lipski, A., Daims, H.: Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge, *Environ. Microbiol.*, Vol. 8, No. 3, pp. 405-415, 2006.
- 21) Koops, H.-P., and Pommerening-Röser, A.: Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species, *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 37, No. 1, pp. 1-9, 2001.
- 22) Chen, G.-H., Wong, M.-T., Okabe, S., Watanabe, Y.: Dynamic response of nitrifying activated sludge batch culture to increased chloride concentration, *Wat. Res.*, Vol. 37, No. 13, pp. 3125-3135, 2003.
- 23) Intrasingkha, N., Keller, J., Blackall, L.L.: Biological nutrient removal efficiency in treatment of saline wastewater, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 39, No. 6, pp. 183-190, 1999.
- 24) Dinger, A.R., and Kargi, F.: Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater, *Environ. Technol.*, Vol. 20, No. 11, pp. 1147-1153, 1999.
- 25) Vredenburg, L.H.J., Nielsen, K., Potra, A.A., Kristensen, G.H., Sund, C.: Fluid bed biological nitrification and denitrification in high salinity wastewater, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 36, No. 1, pp. 93-100, 1997.

(2007.5.25 受付)

Investigation of Inductive Effect of Salinity on Nitrification

Kenichi ABE¹, Akiyoshi OHASHI^{1,2}, Takashi YAMAGUCHI¹, Takaaki TOKUTOMI³

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Nagaoka University of Technology

²Dept. of Social and Environmental Engineering, Hiroshima University

³Kurita Water Industries LTD.

It is still mysterious whether salinity can be an important factor to induce nitrite accumulation in nitrification process. In this study, two airlift reactors with sponge-carriers, fed with an artificial substrate, were operated at 25 and 35°C to investigate the effect of salinity on nitrification. Even though sodium chloride was stepwise increased to 16 gCl · l⁻¹, the nitrite accumulation could not be found. On the contrary, increasing ammonium loading rate under the same salinity condition, nitrite accumulation accompanied with the proliferation of remaining ammonium. From the result, we can conclude that salinity concentration does not play the important factor for nitrification process.