

(25) 二段ステップ流入式上向流型anammoxリアクターにおける処理性の評価

高橋 慶考^{1*}・對馬 育夫²・下川 正貴³・岡部 聡³

¹北海道大学 工学部環境工学科 (〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目)

²国立環境研究所 水圏環境研究領域 (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

³北海道大学大学院 工学研究科環境創生工学専攻 (〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目)

* E-mail: y.takahashi-1983@hotmail.co.jp

本研究は、不織布を生物膜担体として用いた上向流型anammoxリアクターのさらなる窒素除去速度の向上を目的として行った。上向流型anammoxリアクターの中間部付近に基質流入管を挿入し、リアクター下部の流入部と同濃度及び同流量の基質を供給する二段ステップ流入方式運転を行った。また、ステップ流入運転期間中、HRTを段階的に短縮して処理性の評価を行った。二段ステップ流入方式でHRTを0.2 hにまで短縮することにより、リアクター後半のpH上昇が抑制され、リアクター後半部の窒素除去速度が上昇し、リアクター全体として最大 $31.2 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ の窒素除去速度を達成した。この速度は、これまでに報告されたanammoxリアクターによる窒素除去速度として最高である。

Key Words : anammox, Nonwoven, Step feeding, FISH, Phylogenetic analysis

1. はじめに

嫌気性アンモニア酸化(anammox)プロセスは、嫌気条件下でアンモニアと亜硝酸から直接窒素ガスに変換する生物反応である¹⁾。anammox プロセスは、従来の窒素除去プロセスである硝化脱窒法と比較して、酸素及び有機物の供給が不要、さらにこれらを供給するための電力、薬品、また有機物から発生する余剰汚泥量の低減などの特長を有しており、大幅なランニングコストの削減が期待されている²⁾。しかし、anammox 細菌は難培養性の絶対嫌気性細菌であり、増殖速度が極めて遅く集積培養が非常に困難であるため、anammox 細菌の生理・生態に関する知見は極めて少ない。

これまでに著者らは、real-time PCR 法を用いたanammox 細菌の迅速な定量方法・検出方法を開発し、植種汚泥として最も適した汚泥を選択することを可能とした³⁾。さらに、選択した適切な汚泥を不織布を生物膜担体とした上向流カラムリアクターに植種し連続運転を行うことにより、anammox 細菌の効率的な集積培養に成功した⁴⁾。上向流カラムリアクター全体として、高い窒素除去速度は達成できたが、リアクター後半部ではanammox 細菌が十分に存在するにもかかわらず、

anammox 反応がほとんど生じていないことが明らかになった⁵⁾。この理由として、anammox 細菌は pH の上昇により活性阻害を受ける可能性があることが指摘されていることより、著者らのリアクターにおいても、リアクター後半部に存在する anammox 細菌は pH の上昇により阻害を受けた可能性が考えられる。

そこで本研究では、リアクターへの基質流入方式を二段ステップ流入方式に切り替え、HRT を短縮することにより、リアクター後半部における pH 上昇の抑制を試みた。リアクター後半部における pH の上昇を抑制し、リアクター後半部における anammox 活性を高く維持することにより、リアクター全体としての処理能力の向上を図ることを目的とした。

2. 実験方法

(1) リアクター及び運転条件

本実験では、植種汚泥として本研究室で運転を行っている上向流型anammoxリアクター内のバイオマスを使用し、図-1に示すようにポリエステル製の不織布を生物膜担体として充填した内径26 mm、全長280 mm、容積150

mLのガラス製カラム型リアクターに人工無機培地を上向流にて連続供給した。約300日間運転を行い、anammox細菌の馴養を行った後、実験を開始した。本研究におけるanammoxリアクターの運転条件及び人工無機培地の構成を表-1に示す。本研究では、Phase 3、4、5、6において、基質流入管をリアクター中間部に挿入(図-1)することにより、リアクター前半部の流入口より流入する基質と同濃度、同流量の基質を二段ステップ方式で流入させ運転を行った。また、リアクター各部位での処理水を採取し、リアクターの各区分(Zone A-Zone D)での処理性を評価した。anammox反応による窒素ガス生成時に生物膜担体からバイオマスが剥離することを最小限に抑制する目的でリアクターを45度斜めに設置した。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及び $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度は $\text{NH}_4^+\text{-N}:\text{NO}_2^-\text{-N}=1.2:1$ 、 KHCO_3 濃度は500 mg/L、流入水pHは 7.2 ± 0.1 (塩酸により調整)、培養温度は 37°C に設定した。さらに、流出 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度が50 mg/L、pHは流出水のpHが最適pHの上限である8.3以下になるようにそれぞれ調整した。また、培地作成時に窒素ガスで曝気し、溶存酸素(DO)をDO計(DO-5Z, KKK)で測定することにより0.1 mg/L以下にし、ヘッドスペースへ窒素ガスを約5分間置換することで培地を無酸素状態に保った。また、水理学的滞留時間(HRT)を0.1-1.6 hに設定した。リアクターの流入部及び流出部にはテフロン目皿を設置し、培地の容器にはガラス製で茶褐色細口共栓試薬瓶(容積11 L, 23 L)を用い、気体の不透過性に優れているバイトン栓により蓋をした。さらに、窒素ガスを充填したアルミニウムバックを設置することで、培地が減少することにより生じるヘッドスペースへの酸素の混入を防いだ。チューブには気体の不透過性に優れているファーマッドチューブ(PharMed BPT Tubing, MASTERFLEX, Illinois U.S.A)を使用し、培地交換時に毎回超音波洗浄を行った。

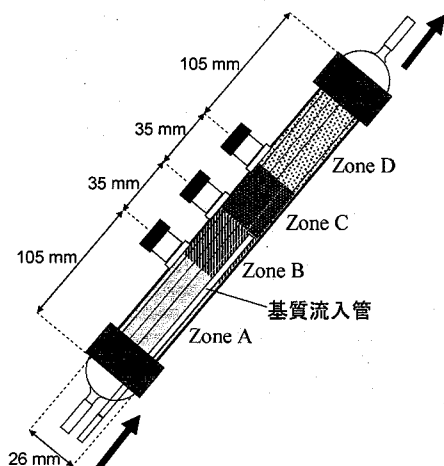


図-1 本研究で用いたガラス製カラム型リアクター

表-1 anammoxリアクターの運転条件

運転期間 (day)	HRT (h)
Phase 1	35
Phase 2	9
Phase 3	40
Phase 4	15
Phase 5	9
Phase 6	16
無機合成培地	[mg/L]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	140-420
NaNO_2	120-410
KHCO_3	500
KH_2PO_4	27
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	180
微量金属元素 (TES I, TES II)	
培養温度	37°C
DO	0.1 mg/L以下
流入pH	7.2 ± 0.1
リアクター容積	150 mL

TES(Trace Element Solution) I

EDTA	15 [g/L]
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.14

TES(Trace Element Solution) II

EDTA	15 [g/L]
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.43
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.24
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.99
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.22
$\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.19
$\text{Na}_2\text{SeO}_4\cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.21
H_3BO_3	0.0014

(2) 水質分析

上向流カラムリアクターの処理性を評価するために、サンプルを 0.2 μm のメンブレンフィルター (DISMIC-13CP, ADVANTEC)で濾過後、イオンクロマトグラフ (DIONEX D-100、陽イオンカラム: IonPac CS3, DIONEX、陰イオンカラム: IonPac AS9-HC, DIONEX)を用いてリアクターの培地及び流出水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 及び $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 濃度を測定した。また、pH 計 (B-212, HORIBA)を用いてサンプルの pH を測定した。

(3) DNA抽出及びPCR増幅

16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行うために、上向流カラムリアクターの前半部(Zone A)、中間部(Zone B + Zone C)、及び後半部(Zone D)からそれぞれバイオマスサンプルを3つずつ採取し(前半部; 3.5 mL、中間部 2.0 mL、後半部 2.5 mL)、DNA 抽出を行うまで -80°C で冷凍保存した。その後、採取したサンプル 200 μL を Fast DNA Spin Kit (BIO101)を用いてDNA 抽出を行った。抽出されたDNAは、Hoefer DyNA Quant 200 (Amersham)を用いて濃度 (ng/ μL)を測定した。抽出されたDNAは -20°C で保存した。

抽出された DNA を Sigma の Taq DNA polymerase と *Plasmidomycetals* 目及び全細菌に特異的なプライマーセット Pla46f⁶⁾及び Univ1387r⁷⁾を用いて PCR 増幅を行った。PCR プログラムは初期変性が 94°C で 5 min, [94°C: 90 sec, 62°C: 90sec, 72°C: 1 min]×25 サイクル、最後に 72°C で 4 min とした。得られた PCR 産物は 1%アガロース電気泳動で確認した。

(4) クロニング、シーケンシング、及び系統解析

PCR 増幅断片は、Wizard PCR Minipreps DNA purification system (promega)を用いて精製後、pGEM-T vector cloning system (promega)を用いてトランスフォーメーションを行った。プラスミド DNA は Wizard Plus Minipreps DNA purification system (promega)を用いて回収・精製し、ほぼ 16S の全領域の塩基配列は ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems)で決定した。得られた塩基配列は、BLAST⁸⁾を用いて相同性を比較した。また、CLUSTAL W パッケージ⁹⁾を用いて Neighbour-Joining 法¹⁰⁾により系統樹を作成した。

(5) バイオフィームサンプルの固定と切片化

FISH 法のための前処理として、上向流カラムリアクターから生物膜サンプルを採取し、4%パラホルムアルデヒド (PFA)溶液で RNA を固定 (4°C、12-24 時間)した。RNA を固定されたサンプルは、PBS で洗浄 (3 分間×2 回)し、OTC-Compound (Tissue-Tek)に浸透させた後-20°C で急速に凍結した。凍結した生物膜ブロックをクライオミクロトーム (CRYOCUT1800, Leica)を用いて、生物膜、不織布共に厚さ 10-20 µm 毎に支持体に対して垂直方向にセクションングした切片を、ゼラチンで被膜済みのスライドガラス (Cel-Line Associates, Inc.)に貼付け、風乾した。サンプルを固定したスライドはエタノール脱水 (50%→80%→96%→50%→80%の順で各 5 分間)し、FISH 法に供するまで-20°C で保存した。

(6) オリゴヌクレオチドプローブ及び FISH 法

FISH 法の手順は、(Amann, 1995)¹¹⁾、(Okabe et al, 1999)¹²⁾の方法に準拠した。FISH 法に用いた蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、全細菌に特異的な EUB338¹³⁾及び *Candidatus Brocadia anammoxidans* 特異的な AMX820¹⁵⁾の 2 種類である。本研究で用いたプローブは最新の 16S rRNA sequencing database に基づく ARB software package (<http://www.arb-home.de/>)の PROBE_DESIGN tool により設計した。また、プローブの特異性は ARB database により確認し、ハイブリダイゼーションの最適条件は実験により決定した。プローブは fluorescein isothiocyanate (FITC)または tetramethylrhodamine 5-isothiocyanate (TRITC)で標識された

ものを用いた。ハイブリダイゼーションは 46°C で 3 時間行い、その後 48°C で 20 分間洗浄を行った。ハイブリダイゼーションしたサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss)を用いて、波長 488 nm (Ar レーザー)と 543 nm (HeNe レーザー)のレーザーでスキャンを行い観察した。

3. 実験結果及び考察

(1) 処理性

a) ステップ流入運転前における処理性

各Phaseにおける流入水中の平均NH₄⁺-N、NO₂⁻-N濃度、及びHRTを図-2に、また、流入窒素負荷、窒素除去速度、及びHRTの経日変化、ならびに各Phaseにおけるリアクター各区分での平均窒素除去速度及び窒素除去に対する寄与率を図-3に示す。さらに、流入水中のNH₄⁺-N 及び NO₂⁻-N濃度は、anammox活性が良好なNH₄⁺-N : NO₂⁻-N = 12:1になるように設定した⁴⁾。また、各Phaseにおける流入水中の基質濃度は、基質の枯渇を防ぐ目的で、流出水中のNO₂⁻-N濃度が50 mg/L付近になるように計算して決定した。Phase 1においてHRTを0.8 hに固定し運転を行ったところ、窒素除去速度は安定的に推移し、平均窒素除去速度は10.2 kg-N m⁻³ day⁻¹(平均窒素負荷; 17.0 kg-N m⁻³ day⁻¹)であり、各区分における窒素除去への寄与率はそれぞれ73%(Zone A)、10%(Zone B)、3%(Zone C)、14%(Zone D)であった。これはリアクター体積比の38%に相当するZone Aにおいて7割以上の窒素が除去され、それ以降の部分では、NH₄⁺-N 及びNO₂⁻-N濃度が十分であったにも関わらずリアクターのパフォーマンスが著しく低下していることを示している。HRTを1.6 hに延長し流入窒素負荷を低下させたPhase 2では、平均窒素除去速度は6.7 kg-N m⁻³ day⁻¹(平均窒素負荷; 10.3 kg-N m⁻³ day⁻¹)とPhase 1に比べて減少した。

b) ステップ流入運転後における処理性

リアクターの運転開始44日目に、リアクターを二段ステップ流入方式に切り替え運転を行った。Phase 3 (前半部HRT; 1.6 h、後半部 HRT; 0.8 h)でステップ流入方式導入後、HRTを段階的に短縮していった。その結果、Phase 5 (前半部HRT; 0.4 h、後半部 HRT; 0.2 h)では、リアクター後半部のanammox活性が上昇し、それに伴いリアクター全体の平均窒素除去速度が26.8 kg-N m⁻³ day⁻¹まで増加した(図-3)。また、Phase 5においては、リアクター後半部 (Zone C + Zone D)はリアクター全体の窒素除去の5割以上に寄与していた。さらにHRTを短縮し窒素負荷を増加したPhase 6において、窒素除去速度が最大の31.2 kg/m³/day

を記録した。しかしながら、運転を継続するに伴い流出水中の NO_2^- 濃度の上昇が確認され、窒素除去速度はこれ以上増加せず、リアクター全体の平均窒素除去速度はPhase 5と同程度 ($26.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$)であった。このことより、Phase 6においてリアクター前半部及び後半部それぞれにおいて窒素除去速度は最大に達したと考えられる。

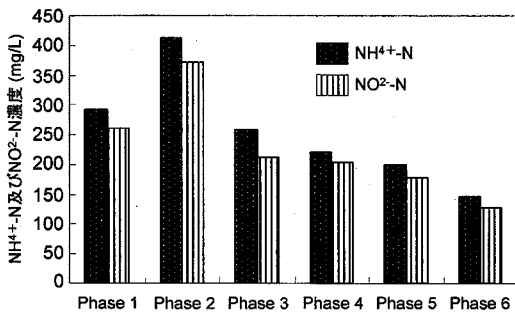


図-2 各Phaseにおける流入水中の平均 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 濃度

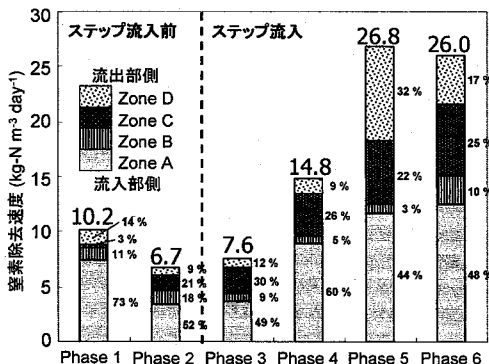
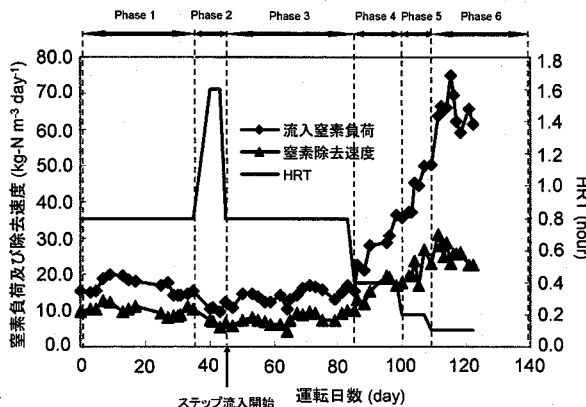


図-3 流入窒素負荷、窒素除去速度、及びHRTの経日変化、ならびに各Phaseにおけるリアクター各区間での平均窒素除去速度及び窒素除去に対する寄与率

(2) 流出水中のpHの変化

流入水のpHを 7.2 ± 0.1 に設定した場合の各Phaseにおける流出水の平均pHを図-4に示す。ステップ流入を導入しHRTを段階的に短縮していくことによって、流出水の平均pHは減少していった。Phase 1において流出水の平均pHは8.2であったのに対し、リアクター前半部及び後半部のanammox活性の上昇が停滞したPhase 5以降では、流出水の平均pHは7.9 (Phase 5)、7.7 (Phase 6)に低下していた。既往の研究により、anammox細菌の活性はpH8.3以上で阻害されるという報告がある¹⁰⁾。著者らの既往の研究において、微小電極を用いて生物膜内のpH分布を測定した結果によると、anammox活性により生物膜内では最大0.5 pHユニット程度液本体よりも高いことが確認されている⁹⁾。従って、ステップ流入導入前のPhase 1及びPhase 2における生物膜内部においては、pHがanammox細菌の最適培養条件 (pH=6.7-8.3) の上限値を大幅に上回っている可能性がある。以上より、流出水のpHの上昇が8.0以下に抑制されたことにより、リアクター後半部のanammox活性が上昇したと考えられる。

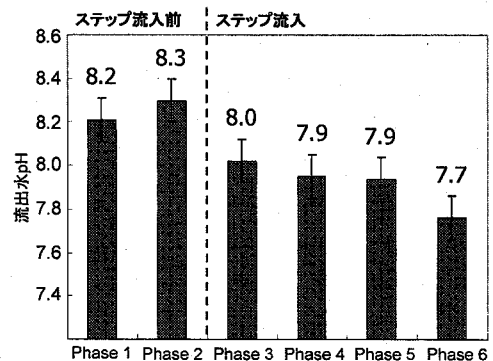


図-4 流入水のpHを 7.2 ± 0.1 に設定した場合の各Phaseにおける流出水の平均pH

(3) 各区間におけるanammox細菌の存在割合

Phase 1 (リアクターの運転開始5日目)において、リアクター前半部 (Zone A)、中間部 (Zone B + Zone C)、及び後半部 (Zone D) のそれぞれの区間よりバイオマスを採取しFISH法を行った。全細菌に特異的な配列を持つプローブ EUB338 及び *Candidatus Brocadia anammoxidans* に特異的な配列を持つプローブ AMX820 により蛍光標識し、EUB338 で標識された全細菌に占める AMX820 で標識された anammox 細菌の存在割合を算出した。その結果、ANAMMOX 細菌のリアクターの各区間での存在割合は、Zone A では95%、Zone B 及び C では94%、Zone D では90%であり、anammox 細菌はどの区間においても極めて高い存在比で存在していた。さらに、Phase 1 (リアク

一の運転開始5日目)において、リアクター前半部 (Zone A) 及び後半部 (Zone D) のバイオマスを対象として、*anammox* 細菌に特異的なプライマーセット Pla46f 及び Univ1387r を用いて 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。系統解析の結果に基づいて作成した系統樹を図-5に示す。その結果、リアクター前半部及び後半部において、それぞれ検出頻度 73%、96%の割合で同種の

anammox 細菌のクローンが検出された。また、検出された *anammox* 細菌のクローンは *Candidatus Brocadia anammoxidans* に対して約 92~96%の相同性を有しており、新種の *anammox* 細菌である可能性が示唆された。以上より、本リアクター内には単一種の *anammox* 細菌が一樣に存在していることが示唆された。

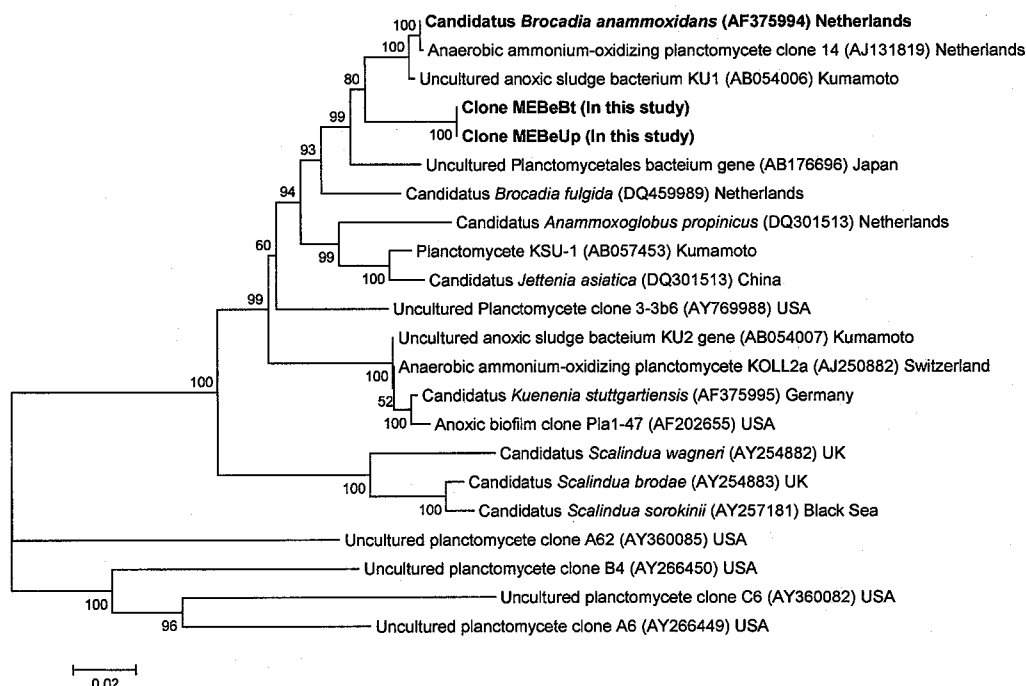


図-5 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析による*anammox*細菌の系統樹(1438 bp)

4. 結論

本研究では、上向流型*anammox*リアクターの窒素除去性能の評価を行った。リアクターを二段ステップ流入方式とし、HRTを適宜短縮して連続運転を行うことにより、リアクター後半部のpH上昇を抑制し、*anammox* リアクター後半部のANAMMOX活性を上昇・維持させることにより、*anammox* リアクター全体として、最大窒素除去速度 $31.2 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ を達成した。

5. 謝辞

本研究は、環境省廃棄物処理等科学研究費補助金「嫌気性アンモニア酸化型メンブレンバイオリアクターを核とした新規浸出水処理システムの開発とDNAチップを用いた処理水の安全性評価手法の確立(K1508)」

により行われた。また、*anammox*リアクターの立ち上げおよび運転に関して、広島大学大学院工学研究科 金田 智則氏にご協力いただきました。ここに付記して深く感謝いたします。

参考文献

- Mulder, A., A. A. van de Graaf, L. A. Robertso and J. G. Kuenen. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol.16, pp.177-183, 1995.
- Strous, M., J. J. Heijnen, J. G. Kuenen, M. S. M. Jetten. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 50, pp. 589-596, 1998.
- Tsushima, I., T. Kindaichi, and S. Okabe. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research*, Vol. 41, pp. 785-794, 2007.

- 4) Tsushima, I., Y. Ogasawara, T. Kindaichi, and S. Okabe. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Research*, Vol. 41, pp. 1623-1634, 2007.
- 5) Kindaichi, T., I. Tsushima, Y. Ogasawara, M. Shimokawa, N. Ozaki, H. Satoh, and S. Okabe. *In situ* Activity and Spatial Organization of Anammox Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. (In press)
- 6) Neef, A., R. Amann, H. Schlesner, and K. H. Schleifer. Monitoring a widespread bacterial group in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*, Vol. 144, pp. 3257-3266, 1998.
- 7) Weisberg, W., S. Barns, D. Pelletier, and D. Lane. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *The Journal of Bacteriology*, Vol. 173, pp. 697-703, 1991.
- 8) Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 215, pp. 403-410, 1990.
- 9) Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, pp. 4673-4680, 1994.
- 10) Saito, N. and M. Nei. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 4, pp. 406-425, 1987.
- 11) Amann, R. L. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, p. 1-15. In A. D. L. Akkerman, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.). *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- 12) Okabe, S., P. H. Nielsen, W. L. Jones, and W. G. Characklis. Rate and stoichiometry of microbial sulfate reduction by *Desulfobrio desulfuricans* in biofilms. *Biofouling*, Vol. 9 (1), pp. 63-83, 1995.
- 13) Amann, R., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, pp. 1919-1925, 1990.
- 14) Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K. H. Schleifer, and M. Wagner. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 22, pp. 434-444, 1999.
- 15) Schmid, M., S. Schmitz-Esser, M. S. M. Jetten, and M. Wagner. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environmental Microbiology*, Vol. 3, pp. 450-459, 2001.
- 16) Jetten, M. S. M., M. Strous, K. T. van de Pas-Schoonen, J. Schalk, U. G. J. M. van Dongen, A. A. van de Graaf, S. Logemann, G. Muyzer, M. C. M. van Loosdrecht, and J. G. Kuenen. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology reviews*, Vol. 22, pp. 421-437, 1999.

(2007.5.25 受付)

Nitrogen removal performance of Two Step-Feeding Up-Flow anammox Biofilm Reactor

Yoshitaka TAKAHASHI¹, Ikuo TSUSHIMA², Masaki SHIMOKAWA³
and Satoshi OKABE³

¹Dept. of Environmental Engineering, Hokkaido University

²Water and Soil Environment Div., National Institute for Environmental Studies

³Dept. of Urban and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Hokkaido University

The anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) process is a new and promising alternative to the conventional nitrogen removal processes. We have previously developed a high rate anammox biofilm reactor. However, no anammox activity was detected at the second half of the reactor even though sufficient amounts of NH_4^+ and NO_2^- and high abundance of anammox bacteria were still present. We, therefore, modified our reactor configuration to two step-feeding system and investigated the performance of the modified two step-feeding up-flow anammox (anaerobic ammonium oxidation) biofilm reactor. A nonwoven fabric sheet was used a carrier material of the biomass in the reactor. Synthetic medium was fed into the reactor at the bottom and the middle part of the reactor at the same flow rate. The reactor was operated over 120 days, during which the HRT was gradually reduced to increase the nitrogen loading rate. During the operation with the two step-feeding, pH at the second half of the reactor was maintained below 8.0, which increased the nitrogen removal in the second half of the reactor. Consequently, a maximum nitrogen removal rate of 31.2 Kg-N/m³/day was attained. To our knowledge, such a high rate has never been reported before.