

無酸素アンモニア酸化（Anammox）微生物を用いた
高負荷型窒素除去システムの開発

**Development of high loading nitrogen removal system
using Anammox microorganisms**

2006年3月

熊本大学大学院自然科学研究科

今城 麗

URARA IMAJO

目次

| | |
|--------------------------|----|
| 第1章 序論 | |
| 第1節 概説 | 1 |
| 第2節 窒素除去技術 | |
| 1-2-1 新しい窒素除去法の探索 | 2 |
| 1-2-2 Anammox 微生物の発見 | 4 |
| 1-2-3 Anammox 微生物の多様性 | 4 |
| 1-2-4 Anammox 微生物の構成 | 6 |
| 1-2-5 Anammox 反応の機構 | 7 |
| 1-2-6 Anammox 反応の特徴 | 8 |
| 1-2-7 Anammox 反応の利点 | 8 |
| 第3節 バイオリアクターの形状と特性 | |
| 1-3-1 バイオリアクターの分類 | 8 |
| 1-3-2 固定化微生物のためのバイオリアクター | 11 |
| 第4節 本論文の目的と構成 | 12 |
| 第1章参考文献 | 13 |
| 第2章 Anammox 微生物の集積培養 | |
| 第1節 概説 | 16 |
| 第2節 実験方法 | |
| 2-2-1 活性汚泥の選定 | 16 |
| 2-2-2 培養方法 | 17 |
| 2-2-3 16S rDNA 解析 | 19 |
| 2-2-4 化学分析 | 19 |
| 第3節 実験結果および考察 | |
| 2-3-1 下水汚泥+し尿処理汚泥の培養結果 | 19 |
| 2-3-2 硝化脱窒汚泥の培養結果 | 21 |
| 2-3-3 Anammox 反応の確認 | 23 |
| 2-3-4 集積培養した微生物の位置付け | 27 |
| 第4節 結語 | 28 |
| 第2章参考文献 | 29 |
| 第3章 リアクター形状の検討 | |
| 第1節 概説 | 30 |
| 第2節 実験方法 | |

| | | |
|------------------------------|--|----|
| 3-2-1 | 種汚泥 | 30 |
| 3-2-2 | 実験装置 | 30 |
| 3-2-3 | 分析方法 | 32 |
| 第3節 実験結果および考察 | | |
| 3-3-1 | 各リアクターの窒素除去速度 | 32 |
| 3-3-2 | 処理の安定性と酸素の暴露との関係 | 34 |
| 第4節 結語 | | 35 |
| 第3章参考文献 | | 37 |
| | | |
| 第4章 Anammox 微生物のグラニュール化の検討 | | |
| 第1節 概説 | | 38 |
| 第2節 実験方法 | | |
| 4-2-1 | ラボ実験 | 39 |
| 4-2-2 | パイロット実験 | 40 |
| 4-2-3 | 分析方法 | 41 |
| 第3節 実験結果および考察 | | |
| 4-3-1 | ラボ実験 | 41 |
| 4-3-2 | パイロット実験 | 42 |
| 4-3-3 | グラニュールの変化 | 43 |
| 4-3-4 | グラニュールの特性 | 45 |
| 第4節 結語 | | 46 |
| 第4章参考文献 | | 48 |
| | | |
| 第5章 Anammox グラニュールリアクターの運転条件 | | |
| 第1節 概説 | | 49 |
| 第2節 実験方法 | | |
| 5-2-1 | 温度の影響 | 50 |
| 5-2-2 | 0次反応の濃度範囲 | 50 |
| 5-2-3 | pHの影響 | 51 |
| 5-2-4 | グラニュールリアクターにおける NO ₂ -N 濃度条件の影響 | 52 |
| 5-2-5 | Anammox グラニュールの NO ₂ -N への暴露の影響 | 52 |
| 第3節 実験結果および考察 | | |
| 5-3-1 | 温度の影響 | 53 |
| 5-3-2 | 0次反応の濃度範囲 | 55 |
| 5-3-3 | pHの影響 | 56 |
| 5-3-4 | 高濃度 NO ₂ -N 添加時のリアクターの処理速度 | 60 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 5-3-5 | 反応停止状態における Anammox グラニューールの NO ₂ -N への暴露の影響 | 65 |
| | 第4節 結語 | 66 |
| | 第5章参考文献 | 68 |
| | | |
| | 第6章 一槽型窒素除去リアクター (CANON リアクター) の検討 | |
| | 第1節 概説 | 69 |
| | 第2節 実験方法 | |
| 6-2-1 | 実験装置および材料 | 70 |
| 6-2-2 | 化学分析 | 71 |
| 6-2-3 | 立上げおよび長期運転 | 72 |
| 6-2-4 | 環境因子の影響検討 | 72 |
| 6-2-5 | 微生物構成の解析 | 72 |
| 6-2-6 | アンモニア酸化菌・Anammox 菌の存在割合の解析 | 75 |
| 6-2-7 | グラニューールとフロックの硝化速度測定 | 76 |
| 6-2-8 | フロック汚泥増加速度の測定 | 76 |
| | 第3節 実験結果および考察 | |
| 6-3-1 | 立上げ時の処理速度変化 | 77 |
| 6-3-2 | 低 DO 濃度域での長期運転結果 | 79 |
| 6-3-3 | pH、温度、DO 濃度の影響 | 80 |
| 6-3-4 | CANON リアクター内の微生物構成 | 82 |
| 6-3-5 | アンモニア酸化菌・Anammox 菌の存在割合の変化 | 87 |
| 6-3-6 | グラニューールとフロック汚泥の硝化速度変化 | 91 |
| 6-3-7 | フロック汚泥の処理速度への寄与 | 93 |
| | 第4節 結語 | 95 |
| | 第6章参考文献 | 96 |
| | | |
| | 第7章 結論 | 98 |
| | | |
| | 謝辞 | 102 |
| | 本論文に関する発表 | 103 |

第1章 序論

第1節 概説

閉鎖性水域の水質汚濁および富栄養化の対策として、第5次水質総量規制により、東京湾、伊勢湾、瀬戸内海において、COD（化学的酸素要求量）に加え窒素およびリンの規制が追加された^{1,2)}。関係20都府県別、発生源別（生活排水、産業排水、その他）に削減目標量が定められ、具体的な措置として、生活排水処理施設の整備、総量規制基準の設定、各種汚濁発生源に係る対策、教育・啓発等を行っていくことが定められている。特に、工場・事業場に対しては、通常の濃度基準による排水規制に加え、汚濁負荷量（排水濃度×排水量）についての総量規制基準が適用されることとなった。この第5次水質総量規制の総量規制基準は平成14年10月1日から新・増設の工場・事業場に適用されており、平成16年4月1日からは既設の工場・事業場に適用されている。この窒素規制の強化の流れに伴い、今後の規制エリア拡大の可能性も合わせて窒素処理技術に対するニーズは非常に高まっている。規制基準を達成するための処理システムの導入と経済的な運転が必須である。

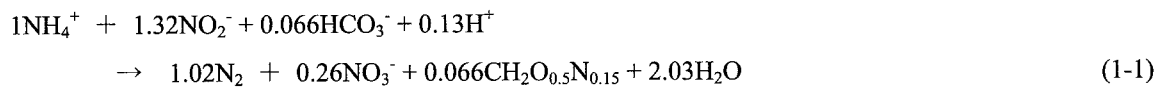
窒素除去技術には物理的方法、化学的方法、生物学的方法があり、排水の性質や量に応じて最適な方法あるいは組合せが選択される。例えば、アンモニアストリッピング+気相酸化触媒分解、液相触媒+生物処理、生物処理単独などである。生物処理法の中にも、活性汚泥法（A₂O法、嫌気好気回分式活性汚泥法、オキシデーショondiッチ法、嫌気好気高濃度活性汚泥・UF膜法等）、生物膜法（循環式嫌気好気生物膜法、嫌気好気流動床・UF膜法等）、包括固定化法（循環式嫌気包括固定化生物膜法、嫌気好気包括固定化活性汚泥法等）、自己造粒法（USB（上向流脱窒スラッジブランケット）・好気生物膜循環法等）がある³⁾。処理方法の選択には、処理プラント設置にかかる初期費用、電気、薬品、触媒、蒸気、汚泥処分費といった運転管理にかかる費用も重要な位置を占める。

生物学的方法は、一般に物理的・化学的処理と比較すると省エネルギー、省資源、低公害といった特徴を持つ。生物による反応は、化学反応に比べて常温、常圧、中性付近のpH領域といった温和な反応条件下での優れた触媒作用であり、かつ基質に対して厳密な選択性があるためである。

一般に生物学的方法と言え、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌を用いて好気条件下でNH₄-Nを酸化する硝化工程と、脱窒細菌を用いて嫌気条件下でNO₂-N・NO₃-Nを窒素ガスに還元する脱窒工程とを組み合わせた硝化/脱窒法が最もよく知られている。これまでに、硝化/脱窒法の欠点である硝化工程でのpH制御と曝気動力、脱窒工程での有機物添加に伴う処理費用増加の問題を解決するために様々な変法が開発されてきた。しかし、硝化工程と脱窒工程の組み合わせであることと、そこで利用される生物種はほぼ同じであるため、根本的な解決には至っていない。

ここ数年、従来の硝化/脱窒法とは異なる微生物による窒素除去反応に関連する発表が数多く出されており、学会や諸雑誌を賑わせている。その中で、Anammox（嫌氣的アンモニア酸化：ANaerobic AMMonium Oxidation）は、オランダ・デルフト工科大学の研究グループにより発見され1995年に初めて論文として発表された、新規な生物学的方法による窒素除去プロセスである⁴⁾。この発表以来Anammox反応に対する注目は非常に大きく、他の研究グループからもこの反応に関する報告が出されている⁵⁻¹⁰⁾。その結果、現在では複数のAnammox微生物が存在すること、またこの微生物が環境中に広く存在し、Anammox反応が地球の窒素サイクルに大きな割合を占めている可能性が指摘されつつある。

Anammox反応は亜硝酸（NO₂-N）を電子受容体としてアンモニア（NH₄-N）を酸化する、微生物による酸化還元反応である。菌体の増殖を加味した反応式は以下のように表される¹¹⁾。



すなわち、1モルのアンモニアを除去するために1.32モルの亜硝酸を必要とし、結果として1.02モルの窒素ガス(N₂)と0.26モルの硝酸(NO₃-N)を生成する。この反応は無酸素条件下で起こること、また有機物を必要としない独立栄養性生物による反応であることから、従来の硝化/脱窒法とは全く異なった、新しい反応であるといえる。

部分亜硝酸化—Anammox プロセスと従来の硝化/脱窒法の化学量論式を比較すると、脱窒工程にAnammoxを利用する場合には、前段の硝化工程では流入アンモニアの約半量を亜硝酸へ酸化するだけの酸素が供給されればよく、理論必要酸素量は約6割低減できる。Anammox反応で生成する硝酸を除去するための有機物添加量は、従来の脱窒の約1割である。また硝化反応、Anammox反応ともに独立栄養性微生物による反応であるため、発生汚泥量にも約8割の低減が見込める。したがって、部分亜硝酸化—Anammox プロセスは、運転費用の大幅な低下が期待できる、従来の硝化/脱窒法に代わる有望な窒素除去方法である。我々はこの微生物反応に着目し、Anammox微生物を実際の窒素除去プロセスに適用することを最終目的として、研究を開始した。

第2節 窒素除去技術

1-2-1 新しい窒素除去法の探索

硝化/脱窒に関わる微生物は、硝化については*Nitrosomonas*、*Nitrosococcus*、*Nitrosospira*、*Nitrobacter*、*Nitrospira*、*Nitrococcus* といった硝化菌が知られている。近年硝化菌についての研究はかなり進んでおり、多種類の硝化菌が同定され、Fluorescent in situ hybridization (FISH)により硝化菌を染色する技術が報告されている¹²⁾。アンモニア酸化、亜硝酸酸化における酵素系(AMO: ammonia monooxygenase、HAO: hydroxylamine oxidoreductase、NOR: nitrite oxidoreductase)についての研究も進んでおり、アンモニア酸化菌を*amoA*遺伝子でモニタリングする手法も報告されている¹³⁻¹⁶⁾。

脱窒は多種類の脱窒菌と総称される細菌によって行われる。無酸素条件下で亜硝酸、硝酸といった結合性酸素を用いた呼吸を行う脱窒能は多様な微生物が有するとされ、微生物の特定は一部しかされていない。脱窒菌は有機物を炭素源とする従属栄養性細菌であり、脱窒工程では流入水中の有機物を利用したり、メタノール等の有機物源を添加するのが一般的である。運転コスト削減を目的に、できる限り流入水の有機物を利用するための硝化/脱窒の槽の配置や循環方法等が様々に工夫されている。Potterら(1998)は、単一汚泥で完全硝化を行う代表的なLudzack-Ettinger (LE)プロセスと比較して、曝気コストを最大16%下げ、循環流に必要なエネルギーコストを28%、さらにリアクター容積を26~44%小さくできる部分硝化/完全脱窒プロセス(PN/CD)を提唱している。しかし、この方法は液循環の方法や槽の配置を工夫したものであり、従来の硝化脱窒の微生物を利用することには変わりはない¹⁷⁾。

Verstraeteら(1998)は、近年の硝化脱窒に関する新規技術を総説し、SHARON、Anammox、De-ammonification、OLAND、methanotrophsによる硝化脱窒を紹介している¹⁸⁾。

SARONとは、Single reactor High activity Ammonia Removal Over Nitriteの略で、オランダのデルフト工科大で開発された¹⁹⁾。高温域においては*Nitrobacter*は*Nitrosomonas*と比較して増殖速度が遅いことを利用し、完全混合で汚泥滞留のないリアクターを短い滞留時間(例えば1日程度)で運転すること

により、*Nitrobacter* をウォッシュアウトさせる。間欠曝気運転の無酸素条件下で、炭素源を添加して脱窒を行うと共に pH を制御する。この運転法により、酸素供給量を 25%、還元剤を 40% 節約することが可能である。一時的に亜硝酸が蓄積するため副作用を明らかにする必要があるが、実プラントが既に稼動している。

De-ammonification とは、Hannover 大学が報告している方法であり、アンモニアが化学量論的な電子供与体なしに窒素ガスへ変換される。このプロセスの原因となる微生物はまだ知られていないが、鍵となるのは酸素供給であり、厳密に制御されなければならない。Muller ら (1995) によると、独立栄養の硝化汚泥は極低い酸素圧 (1kPa あるいはガス相の約 0.2%O₂) において窒素ガスを生成することができる。0.3kPa の溶存酸素下において最大 58% のアンモニア酸化が観察されたが、安定かつ実用的なプロセスデザインはまだ達成されていない。Binswanger ら (1997) もまた高アンモニア排水の硝化/脱窒工程における好気アンモニア除去を報告している。回転円盤法において、有機炭素を添加せずに、表面負荷 2.5gN/m²/d で 90~250gN/m³/d を達成しており、亜硝酸の一部が、アンモニアの酸化において作られる NAD⁺ により還元されているのではないかと仮説を提唱している。

OLAND とは、Gent 大学が報告している Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification の略であり、独立栄養の硝化汚泥を用いたアンモニア除去方法である²⁰⁾。アンモニアが亜硝酸に硝化されるだけの量の酸素を供給すると、電子受容体の不足により、残りのアンモニアの酸化に生成した亜硝酸が消費される。*Nitrosomonas* 種による亜硝酸の不均化反応は、Abeliovich ら (1992) によって報告されていた²¹⁾。*Nitrosomonas europaea* は嫌気条件ではピルビン酸とアンモニアを電子供与体として利用し、1.0mM 程度の濃度の亜硝酸を電子受容体とする反応 (亜硝酸呼吸) を行うとしている。この OLAND 法では酸素供給の制御が難しいが、pH 制御された曝気を行うことにより 50mgN/L/d の窒素除去速度を達成している。Verstraete らの研究グループはその後も回転円盤法によるアンモニア除去の研究を継続しているが、最近ではバイオフィーム中に硝化菌と Anammox 菌に近縁の微生物の存在が確認されたと報告している²²⁾。

Nitrosomonas による脱窒は他の研究者も報告している。Poth と Focht (1985) は *Nitrosomonas europaea* が酸素ストレス下で亜硝酸を最終電子受容体とする脱窒を行い、N₂O を産生することを発見している。Poth (1986) は、*Nitrosomonas* による亜硝酸から窒素ガスへの脱窒を発表しており、この *Nitrosomonas* sp. は炭素源として CO₂ を利用し、アンモニアの酸化によってエネルギーを得る、グラム陰性、運動性、短桿状菌、独立栄養性細菌である²³⁾。Bock (1995) らは *Nitrosomonas* (*Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas eutropha*) が酸素制限下では硝化と脱窒を同時に行うことができ、アンモニアか水素を電子供与体、亜硝酸を電子受容体として脱窒を行い N₂O と窒素ガスを生成するとしている (しかし、その条件下では細胞の増殖が測定できなかった)²⁴⁾。Schmidt (1997) らは NO₂ ガスが存在すれば、*Nitrosomonas eutropha* が嫌氣的にアンモニアを酸化すると報告している²⁵⁾。アンモニアは硝化され、ヒドロキシルアミンを中間生成物として亜硝酸と NO が生成する。生成された亜硝酸の 40~60% が N₂O を中間生成物として窒素ガスに脱窒される。Zart (1998) らは NO₂ あるいは NO ガスを *Nitrosomonas eutropha* に与えることにより、アンモニア酸化速度、増殖速度、細胞密度が上がり、さらに生成した亜硝酸が好気条件下で窒素ガスとわずかな N₂O に脱窒されたと報告している²⁶⁾。NO ガスを添加した細胞は、対数増殖期の最初の数日のみしか高速の好気性脱窒を行わなかったが、NO₂ ガスを添加した系は好気性脱窒による窒素の減少が継続した。

Methanotrophs による硝化脱窒については、Amaral (1995) らが脱窒への methanotrophs の影響を研究し、

メタンを栄養源として増殖し活性を有する少なくとも3種類の脱窒菌を単離している²⁷⁾。

Methanotrophic 活性は、酸素圧を減らすこと、および有機物を脱窒菌に供給することによって脱窒をサポートしていることがわかった。特徴的なのは、低酸素条件下での硝化/脱窒が高温性の methanotrophs によって維持されていることである (Pel ら(1997))²⁸⁾。硝化菌の働く温度範囲は5°C~45°Cに限られていたが、53°Cにおいて酸素が存在すれば、methanotrophs がメタンのない条件でアンモニアを酸化できることが示されている。生成された硝酸は即座に脱窒される。

アンモニアの酸化と亜硝酸の還元との組み合わせは新しいものではなく、Ritchie と Nicolas(1972)が既に好気条件下でアンモニアとヒドロキシルアミンの酸化によって N₂O が生成されることと、亜硝酸の還元は好気・嫌気両条件下で起こることを結論付けている。Broda(1977)は、亜硝酸または硝酸を酸化体としてアンモニアを窒素ガスへ変換する化学合成細菌は、進化論的、また熱力学的には存在が期待されているがまだ検出できていないとし、Anammox 反応が理論的には可能であるとの認識を示している²⁹⁾。したがって、アンモニアと亜硝酸の組み合わせによって窒素を除去するという Anammox や OLAND といったプロセスの新規性は、既に報告されていた生物化学を実用化した点であると言える。

これらの新しい技術は、有機物除去後に無機窒素を窒素ガスとして除去する場合に効果的であり、有機物を嫌気消化によりメタンという有用な生産物として回収する最近の環境技術の潮流に合致している。課題は、実用化のための信頼性を得るための長期試験の実施、考えられる副作用を精査すること、そして関与する微生物を明らかにすると共に、自然環境への影響を明らかにすることである。

1-2-2 Anammox 微生物の発見

1990年に、Delft 工科大の Kluyver Institute for Biotechnology の van de Graaf らは、硝酸を電子受容体として与えるとアンモニアが窒素ガスに変換されるという新しいプロセスを初めて報告した³⁰⁾。長期にわたってモニタリングしていた嫌気性排水処理プロセスで、原因不明の窒素の消失が起こったことが研究のきっかけであった。その後、5年のブランクの後1995年に初めて論文として Anammox 反応が発表され、1997年に真の電子受容体は亜硝酸であることが明らかになった^{4,31)}。

さらにこのプロセスに関連する微生物の単離が試みられた。Strous らは反応槽から取り出したバイオフィルムを超音波により分散させ、Percoll 密度勾配遠心により99.6%まで純化した。この細胞の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を調べたところ、Anammox 菌はこれまで知られていた最も近いバクテリアでも相同性が80.2%しかなく、Planctomycetes 門 (phylum) に属する新規な細菌であることが明らかとなった³²⁾。この微生物は *Candidatus Brocadia anammoxidans* と命名された³³⁾。

1-2-3 Anammox 微生物の多様性

データベース (GenBank) には平成17年3月現在、部分配列も含め少なくとも45種類以上の Anammox 微生物の塩基配列が登録されている。最初の Anammox 微生物として知られるようになった *Candidatus Brocadia anammoxidans* (Accession Number: AJ131819, AF375994) に次いで、*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (AF375995 他9クローン)³⁴⁾、Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete KOLL2a (AJ250882) が別の反応槽から発見され、系統樹から *Candidatus Brocadia anammoxidans* とは異なるグループを形成することが確認された。最近になって黒海で発見されたクローン (*Candidatus Scalindua sorokinii* (Black Sea clone) (AY257181)) や南極海の大陸棚から発見された海洋性の Anammox 微生物 (Uncultured planctomycete MERTZ_2CM_127 (AF424463))、さらに浸出水の処理プラントから発見された *Candidatus Scalindua brodae* (AY254883)、*Candidatus Scalindua wagneri* (AY254882) が加わり、また別のグループを形成している。Anammox 微生物は大きく分けて3つのグループに分かれており、

Anammox 微生物は複数の属から構成される多様な一群のバクテリアであるといえる。Fig.1-1 に 2005 年に発表された Anammox 微生物の系統樹を示す³⁵⁾。

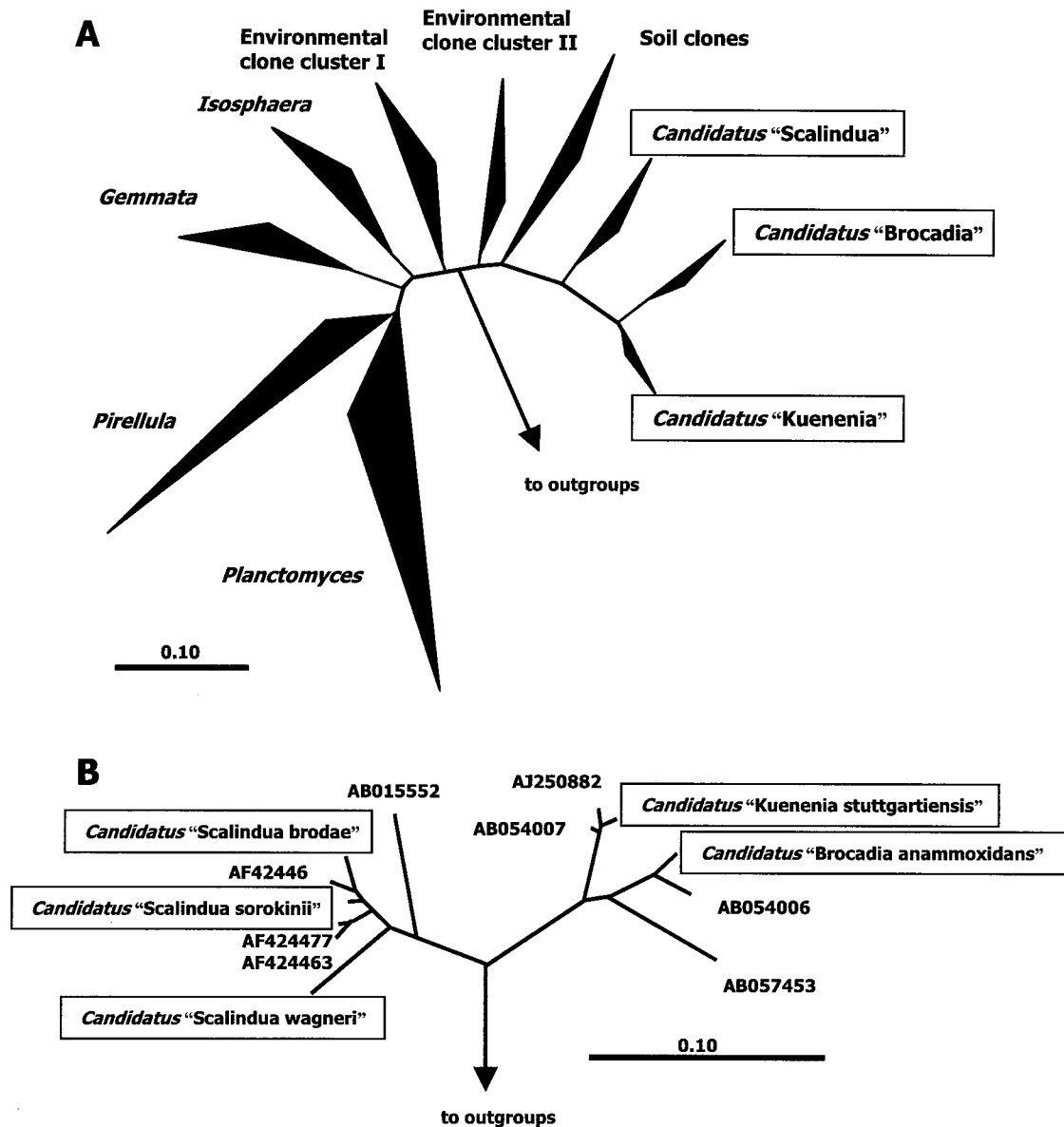


Fig.1-1 (A) 16S rRNA gene-based phylogenetic tree reflecting the relationship of "*Ca. Scalindua*," "*Ca. Brocadia*," and "*Ca. Kuenenia*" to other *Planctomycetes* and other reference organisms. Tree reconstruction was performed by maximum likelihood analysis with a 50% conservation filter for *Bacteria*. Neighbor-joining and maximum parsimony analysis with different conservation filters verified the tree topology. The triangles indicate phylogenetic groups. The bar indicates 10% sequence divergence. (B) 16S rRNA gene-based phylogenetic tree reflecting the relationship of "*Ca. Scalindua brodae*," "*Ca. Scalindua sorokinii*," "*Ca. Scalindua wagneri*," "*Ca. Brocadia anammoxidans*," and "*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*" to other sequences (given as GenBank accession numbers) derived from environments and bioreactors performing the anammox reaction. Tree reconstruction was performed by maximum likelihood analysis with a 50% conservation filter for *Planctomycetes*. Neighbor-joining and maximum parsimony analysis with 50% conservation filters for *Bacteria* and *Planctomycetes* verified the tree topology. The bar indicates 10% sequence divergence. (Schmid, AEM, 2005)

1-2-4 Anammox 微生物の構成

Anammox 微生物は直径 $1\ \mu\text{m}$ 以下の球菌で、他の *Planctomycetes* と同様に発芽によって増殖する。細胞内部は **Fig.1-2** に示すようなコンパートメントに仕切られている。細胞膜の内側に intracytoplasmic membrane があり、それに囲まれた領域に DNA が収納される nucleoid、リボソームを含む riboplasm、anammox 反応に関係する anammoxosome がある³⁶⁾。Anammoxosome を仕切る膜の脂質成分には、**Fig.1-3** に示す anammox 微生物特有の特殊な環状構造を有する脂質が含まれており、ladderane 脂質と名付けられている³⁷⁾。黒海の anoxic な水域において、この ladderane 脂質濃度と anammox 活性のプロファイルが一致することが明らかにされ、深層域から上方に拡散するアンモニアが Anammox 微生物によって消費されることが Kuypers らによって証明された¹⁰⁾。Anammox 反応は anammoxosome を仕切る膜の両側で進行するが、ladderane 脂質は密度の高い堅い膜を形成し、毒性のある反応中間体のヒドラジンとヒドロキシルアミンの拡散を防ぎ、効率的なエネルギーの産生に寄与していると考えられている。この ladderane 脂質の特殊な構造は、細胞分裂の際に細胞骨格の役割を果たす可能性も考察されており、そうであれば anammoxosome は新規な多機能オルガネラであるとともに、細胞分裂のメカニズムの進化を解明する手掛かりになる可能性があると考えられ、今後の研究が期待される。

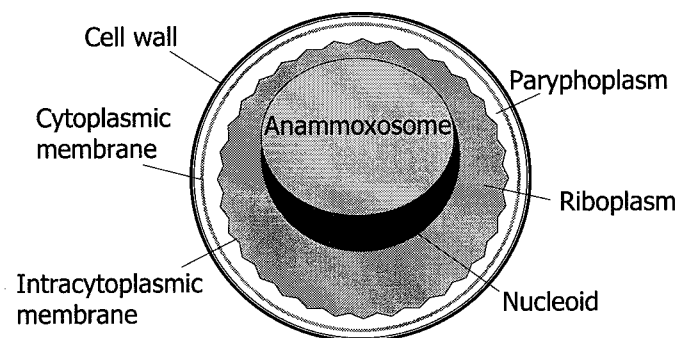


Fig.1-2 Schematic representation of anammox cells(van Niftrik et al., FEMS Microbiology Letters, 2004)

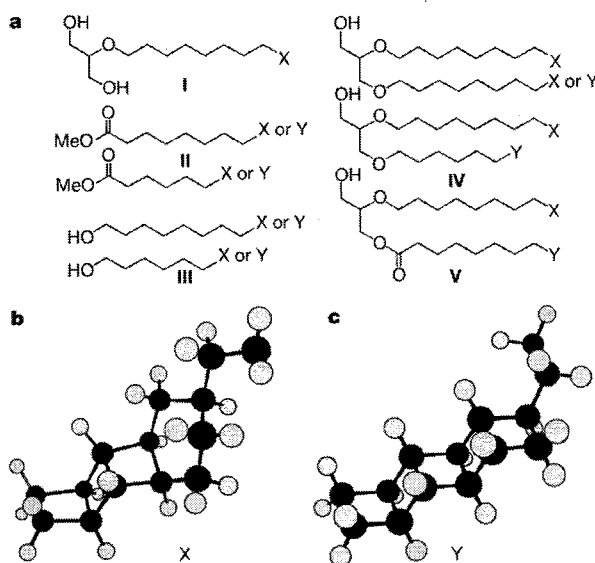


Fig.1-3 Structures of the anammox ladderane membrane lipids; a, General chemical structures of unique membrane lipids of anammox bacteria. b, c, Three-dimensional representation of ring structures X and Y. Carbon and hydrogen atoms are represented by black and grey balls, respectively. In b and c the first two carbon atoms of the side chains of these ring structures are indicated for reference. The structural identifications are based on high-field NMR determination and quantum-chemical simulations with density functional theory (B3LYP/6-31G). (Sinninghe-Damste et al., Nature, 2002)

1-2-5 Anammox 反応の機構

Anammox 反応の反応機構を Fig.1-4 に示す。Anammox 反応は anammoxosome 膜とその両側、すなわち anammoxosome と cytoplasm で起こるといふ仮説が提唱されている。まず亜硝酸がヒドロキシルアミンに還元される。このヒドロキシルアミンがアンモニアと酸化還元反応を起こしてヒドラジンが生成する。ヒドラジンは窒素ガスへ酸化され、生じた電子が亜硝酸の還元に使われる。この結果、亜硝酸とアンモニアから窒素ガスが生成し、プロトンが anammoxosome に輸送される³⁴⁾。中間生成物としてヒドラジンを有するこの反応経路は従来の硝化脱窒の経路とは全く異なっている³¹⁾。Fig.1-5 に示すように、この反応には3種類の酵素、亜硝酸還元酵素 (NIR)、ヒドラジン生成酵素 (HH: hydrazine hydrolase) とヒドラジン酸化酵素 (HZO) が作用する。酵素の精製と性質の研究も進んでおり、Anammox 微生物から精製されたヒドラジン酸化酵素 (HZO) の性質が報告されている。ただし、この酵素はヒドロキシルアミン酸化活性の方が高いため、報告された論文の中ではヒドロキシルアミン酸化酵素 (HAO) と呼ばれている³⁸⁾。主となる反応はこのアンモニアと亜硝酸の窒素ガスへの転換反応であるが、同時に少量の亜硝酸が硝酸へ酸化される。これは微生物の増殖に使われる炭酸固定のための還元等量を産生するためと考えられる³⁹⁾。

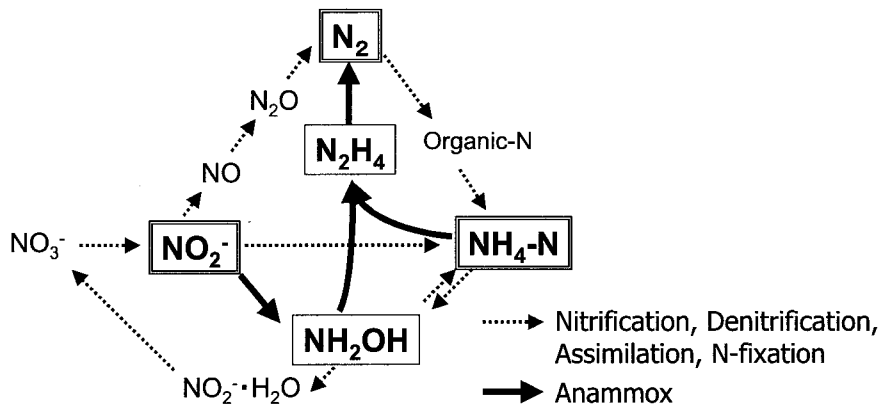


Fig.1-4 The metabolic pathway of anammox reaction

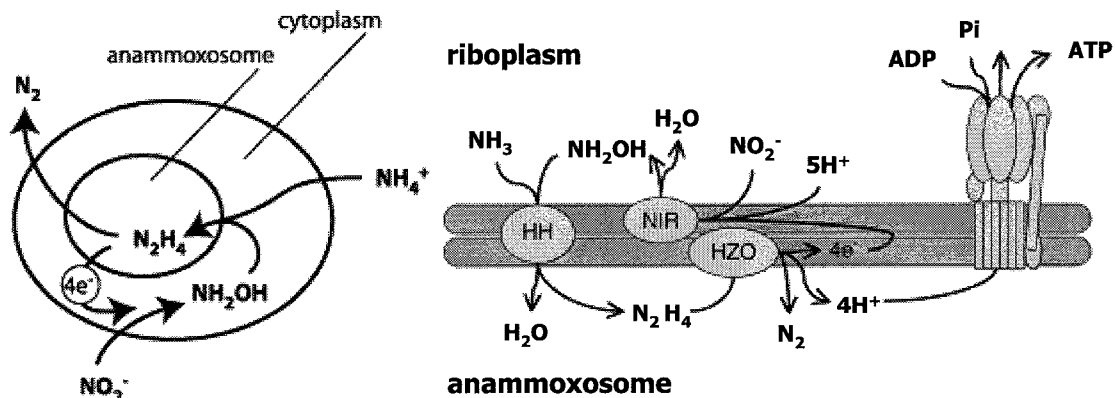


Fig.1-5 Postulated anaerobic ammonium oxidation coupled to the anammoxosome membrane in anammox bacteria resulting in a proton motive force and subsequent ATP synthesis via membrane-bound ATPases. HH: hydrazine hydrolase; the hydrazine-forming enzyme, HZO: hydrazine-oxidizing enzyme, NIR: nitrite-reducing enzyme. (van Niftrik et al., FEMS Microbiology Letters, 2004)

1-2-6 Anammox 反応の特徴

Anammox 微生物は、アンモニアと亜硝酸を基質とするという性質の他に、増殖速度 μ が $0.0027 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ すなわち倍加時間が 10.7 日であり増殖速度が極めて遅い、また酸素への暴露により可逆的な反応阻害を受けるといった性質を有する⁴⁰⁾。また、基質となる亜硝酸は 100mgN/L 以上の濃度になると Anammox 反応に阻害を与えることも報告されている⁴¹⁾。温度や pH 等、増殖に適する条件を調べた報告も出されており、至適 pH は $7.0\sim 8.5$ (最大速度は 8.0)、至適温度は $30\sim 36^\circ\text{C}$ 付近とされている⁴²⁾。

1-2-7 Anammox 反応の利点

アンモニアと亜硝酸が直接窒素ガスに転換される反応は、1:1 のモル比で行われる。炭酸固定に伴う亜硝酸の硝酸への酸化を加味すると、アンモニア 1 モルに対し、亜硝酸は 1.31 モル、生成される硝酸は 0.26 モルとされる。排水処理においては、流入する原水に含まれる窒素源は大部分がアンモニアであると考えられるため、Anammox プロセスの前段階でアンモニアの約半分を亜硝酸に酸化すれば、Anammox プロセスでアンモニアと亜硝酸は窒素ガスとして除去され、流入するアンモニアの約 11% が硝酸として排出される計算になる。仮に、部分亜硝酸化—Anammox—後脱窒というプロセスで窒素除去を行うとし、かつ流入する排水中に脱窒に利用できる有機物源が含まれないとすると、従来の硝化脱窒と比較して理論必要酸素量は約 4 割、脱窒の有機物源の必要量が約 1 割で済むなど、運転費用低減効果大きい。この低減効果は、処理対象排水の窒素濃度が高いほど、かつ有機物濃度が低いほど大きい。また、Anammox 微生物は独立栄養性微生物であり収率が低いことから、汚泥の発生量も従来の硝化脱窒と比較すると約 2 割で済み、大幅に減らすことができる。したがって、汚泥の処理費用が上昇すると予想される将来においてそのメリットは大きいと思われる。また反応経路の中間生成物に亜酸化窒素がなく、従来の硝化/脱窒のように温暖化ガスを発生する懸念がない。したがって、環境負荷低減の面でも優れていると言える。

物理的処理や化学的処理が比較的明確で単純な原理に基づく処理法であるのに対して、生物学的処理は有害物質や負荷変動に対して影響を受けやすい、いわゆるブラックボックスのような処理法であると考えられているが、Anammox 反応に関して言えば、基質・反応経路・反応割合等が明確であり、Anammox 微生物を主体とする処理法は、化学的処理法に近い扱いができると考えられる。

第 3 節 バイオリアクターの形状と特性^{43,44)}

1-3-1 バイオリアクターの分類

望ましい生物排水処理プロセスとは、処理水の水質は大前提の必須条件であるが、さらに、

- ・設備費、運転費が少ない
- ・余剰汚泥の生成が少ない
- ・原水の水量変動や水質 (BOD、温度、pH など) 変動 (日間変動および年間変動) に対して応答性がおだやかでショックローディングに強い
- ・管理、制御が容易である

などの諸条件を満たしていることが必要である。生物排水処理プロセスを設計・操作するにあたっては、上記の条件を可能な限り満足するように最適化を行う必要がある。

Anammox 微生物を用いた処理システムのリアクター選定にあたり、微生物の培養に用いられている様々な形式のリアクターの特徴を整理する。酵素反応および微生物反応に使用されるバイオリアクタ

一の分類を **Table 1-1** に示す。それぞれのリアクターの特性を以下に述べ、利点及び欠点を **Table 1-2** にまとめる。

Table 1-1 Classification of bio-reactors

| | | Aerobic | Anaerobic |
|----------------------------|---|--|--|
| Suspended microorganisms | homogeneous phase system | — | Stirred tank reactor |
| | Gas-liquid two-phase system | Stirred tank reactor Bubble column Airlift column | — |
| Immobilized microorganisms | Immobilization, clathration (biocatalyst) | Stirred tank reactor Suspension bubble column Airlift column Fixed-bed reactor Fluidized-bed reactor | Stirred tank reactor Membrane reactor Fixed-bed reactor Fluidized-bed reactor |

1) 攪拌型リアクター

最も広く用いられているリアクターである。攪拌槽内の流動は三次元的で非常に複雑であり、気体が吹き込まれる場合はさらに複雑である。攪拌槽内の現象について数多くの研究報告がなされているが、経験的手法による実験データの整理が主に行われ、普遍的な結論を引き出す方向には進んでおらず、リアクターの設計法は確立されていない。現在の設計は古くからの経験を基礎に行われている。装置上の欠点は、培養中の発泡が激しい時、槽内の実容積を大きくできない、または消泡剤の使用量が增大する。また攪拌に要する動力が大きく、大型になると消費動力の経済性の問題ばかりでなく、攪拌器の構造でも制約を受ける。

2) 気泡塔型リアクター

このリアクターでは、攪拌と通気を底面に設置した通気管からの気泡により行う。攪拌効果を高めるには、通気孔が槽底の断面一面に均一に開けられていなければならない。一定の間隔で孔を開けた環状のパイプ、パイプを平行に並べたもの、あるいは放射状に設置したパイプが用いられる。

3) エアリフト型リアクター

この円筒型の搭状リアクターは、上部と底部で中の培養液が通じている2本の円筒でできている。空気は、底部から内側の円筒に通気される（上昇塔）。空気は上昇して頂上部から外に抜ける。そのため外側の円筒（下降部）に空気はほとんどない。この通気により、リアクター内の培養液は上昇塔と下降塔の間を循環する。この循環の原理は、上昇塔と下降塔の液との密度の差にある。

エアリフトを含む気泡塔型リアクターはバイオリアクターの大型化に伴い注目されてきた。従来の攪拌槽型リアクターと比較してリアクター内の混合によるせん断応力が小さく、かつ酸素供給が十分に行えるものとして注目される。気泡塔型リアクターは動力が空気を吹き込む通気によるものだけであり、攪拌槽型と比較すると内部構造が簡単で、細胞のせん断損傷が少ない。また大型になるほど総消費動力が小さくて済み、メリットが大きくなる。しかし、混合がかなり穏やかであるという問題があるため、ドラフトチューブ付き塔型リアクター（内ループエアリフトカラム）、循環式塔型リアクター（外ループエアリフトカラム）、多段塔型リアクター、多孔板・ドラフトチューブ付きリアクター、

気体巻き込み式塔型リアクターなどの改良型が考えられている。ループ型のリアクターは高い酸素移動速度を達成することができ、実際にバイオテクノロジープロセスで稼働しているものも多いが、ドラフトチューブのサイズやスパージャーの型式や設置場所について、まだ研究途上の部分がある。気泡塔型リアクターの論理的な解析は、液循環流のモデル化（セルモデル、循環流モデル等）を基礎に行われ、リアクター設計のための消費動力、混合時間および混合拡散係数、ガスホールドアップ、比界面積、容量係数 (k_La) について計算方法がまとめられている。

4) 充填型リアクター

微生物および菌類の細胞を保持した充填材を詰めた円筒型の塔からできている。このリアクターは、上昇型、下降型のいずれでも操作できる。

Table 1-2 Comparison of bio-reactors

| | Advantage | Defect |
|--------------------------------|--|---|
| Stirred tank reactor | <ul style="list-style-type: none"> • There is enough experience because it has been widely used. • Control of pH and temperature is easy. • Scale-up is comparatively easy. • It can treat even colloidal and indissoluble substrate. | <ul style="list-style-type: none"> • It needs big power to agitate. • Internal structure is complicated and is hard to hold washing. • Contamination is easy to occur so that there is a bearing. • Cell is easy to catch the damage by agitating blade. • Maximum size of this type of reactor is not so big. |
| Bubble column (Airlift column) | <ul style="list-style-type: none"> • Contamination is hard to occur because there is no bearing. • Internal structure is simple. • Energy consumption is little. • Mixture is comparatively uniform. • It can be grown in size. | <ul style="list-style-type: none"> • Gas dispersion is bad in the case of high liquid viscosity |
| Fixed-bed reactor | <ul style="list-style-type: none"> • Because a flow is almost a piston flow, reaction occurs efficiently. • Catalyst load per a reactor unit volume is much. | <ul style="list-style-type: none"> • As there is density distribution of substrate and products in an axis direction, distribution of immobilized enzyme deactivation can occur in an axis direction. • Pressure loss is big. • Control of pH and temperature is difficult. |
| Fluidized-bed reactor | <ul style="list-style-type: none"> • Heat and material transfer characteristic are good. • It can handle slightly powdered substrate. • A pressure loss is not so big in comparison with the fixed-bed reactor. | <ul style="list-style-type: none"> • Design and scale-up are difficult. • A optimum range of speed for a good fluidity state is narrow. |
| Membrane reactor | <ul style="list-style-type: none"> • A pressure loss is not big in the case of a plate type and a spiral type. • Scale-up is easy. • Enzyme can be immobilized without special processing. • Aseptic operation is possible. | <ul style="list-style-type: none"> • Performance deteriorates by a dirt and blocking of a membrane. • It needs much cost for scale-up. |

1-3-2 固定化微生物のためのバイオリアクター

バイオリアクターにおいては、生体触媒はリアクター内に保持されていなければならない。そのためには、反応液と生体触媒とを容易に分離する必要がある”固定化”の必要性がでてくる。固定化により、生体触媒を連続的に、繰り返して使用できるばかりでなく、生体触媒の欠点である不安定性を改善することができる。

固定化に当たっては目的に応じてどの方法を採用するかを判断しなければならない。担体が安価であり、固定化の費用も安価であることはもちろん、再使用が可能であること、調整の容易さ、強い結合力、高い機械的強度などが求められる。

微生物を固定化すると一般に総括（見かけ）反応速度（物質移動を含めた速度）が低下する。遊離微生物に比較して総括反応速度を低下させる要因には、基質の液本体から固定化粒子表面への拡散における抵抗、粒子表面から反応部位までの拡散抵抗、そして反応速度自体の低下がある。

固定化法は担体結合法、架橋法、包括法の3種類に分類される。担体結合法は水不溶性の担体に微生物を結合させ固定化する方法である。担体の粒子サイズや網目構造の状態などによって結合量が異なり、単位重量当たりの活性に差が出るので、結合方法と共に担体の種類の影響が大きい。また、基質と担体の相互作用や基質の網目構造内部への浸透性なども考慮しなければならない。結合様式によって共有結合法、物理的吸着法、イオン結合法の3つに分けられる。架橋法は、酵素を二個またはそれ以上の官能基を有する化学試薬を用いて、微生物と微生物を架橋することにより固定化する方法である。微生物の細胞壁あるいは細胞膜を強固にすると同時に微生物間に架橋を形成させて固定化する。前述の共有結合法と同様、共有結合によって固定化する方法であるが、水不溶性の担体を使用しない点で異なっている。使用される試薬は二価性または多価性で、酵素同士を架橋することによって水不溶性のポリマーを作り出している。試薬としてグルタルアルデヒドを用いる方法が最も多く使用されている。包括法は、高分子物質を通さずに低分子物質を通すような壁や膜で包み込んでしまう方法である。担体結合法や架橋法と異なり、酵素自身は固定化反応に関与していないため、安定な固定化ができる可能性が高い。しかし、膜を透過できない基質や生成物を含む系への適用が不可能である。包括法は格子型とマイクロカプセル型に分類できる。格子型は微生物を格子状のゲルマトリックス内に包括する方法である。格子型に用いる高分子化合物としてポリアクリルアミドゲルが適しており広く用いられている。微生物の固定化には主としてゲル包括法が用いられる。他に担体結合法や架橋法、物理吸着法も一部用いられている。

リアクターを設計するにあたっては、固定化物の形状、サイズ、機械的強度および比重、反応速度式の形、基質の特徴、固定化物の再生、物質移動特性、雑菌汚染対策、リアクターの建設および運転のコストなどを考慮し、これら多くの因子を総合して最適なリアクターを判断しなければならない。固定化微生物のためのリアクターの基本形式として、充填層、攪拌槽、流動層、中空糸膜リアクターが挙げられる。それぞれのリアクターの特徴をまとめたものを **Table 1-3** に示す。

Table 1-3 Characteristics of reactors for immobilized microorganism

| | Stirred tank reactor | Fixed-bed reactor | Fluidized-bed reactor | Hollow-fiber membrane |
|--|----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| Operation | easy | easy | difficult | easy |
| Replacement of carrier | easy | difficult | easy | easy |
| Pressure loss | small | big | small | big |
| Removal of cell | easy | difficult | easy | easy |
| characteristics of mixing | good | defective | good | very good |
| oxygen transfer | good | defective | good | very good |
| Distribution of cell | homogeneous | heterogeneous | homogeneous | heterogeneous |
| Wear of carrier | much | little | little | little |
| Scale-up | easy | easy | difficult | difficult |
| Cost | low | low | high | low |
| Appropriateness In the case of end product inhibition | defective | good | very good | good |
| In the case of substrate inhibition | good | defective | very good | defective |
| Reactor control | easy | difficult | easy | difficult |

第4節 本論文の目的と構成

本論文は、Anammox 反応を利用した高負荷型窒素除去システムを構築することを目的として平成 10 年に行った研究をまとめたものである。以下、第 2 章では Anammox 微生物の取得を目的とした活性汚泥の初期培養方法と、得られた Anammox 微生物と既知の Anammox 微生物との関係について述べる。第 3 章では、Anammox 微生物を用いた窒素除去法の実排水への適用を目的としてリアクター形状の検討を行った結果について述べる。第 4 章では、高負荷が期待できる Anammox グラニュールリアクターの構築を目指し、Anammox 微生物のグラニュール化の検討をラボスケールとパイロットスケールのリアクターを用いて行った結果を述べる。第 5 章では Anammox グラニュールリアクターの運転条件について、至適範囲を知るとともにトラブル時のリアクターの状態を把握する目的で検討を行った結果について述べる。第 6 章では Anammox グラニュールを活用した単一型窒素除去リアクターとして、部分亜硝酸化と Anammox を同一槽内で行わせる CANON (Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite) 法をガスリフト型リアクターで検討した結果を述べる。第 7 章で本研究をまとめる。

第1章参考文献

- 1) 環境省HP (<http://www.env.go.jp/water/heisa/tpic.html>)
- 2) 東京都環境局HP (http://www2.kankyo.metro.tokyo.jp/kaizen/kisei/mizu/suidakuhou/souryou/souryou_n.htm)
- 3) 稲森悠平, 孔海南, 吳曉磊, 須藤隆一 (1995) 高濃度有機性排水処理の高度化の重要性と動向, 用水と廃水, **37**(10), 785-794.
- 4) Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, *FEMS Microbiology Ecology*, **16**, 177-184.
- 5) Helmer, C., Tromm, C., Hippen, A., Rosenwinke, K.-H., Seyfried, C.F. and Kunst, S. (2000) Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems, *1st World Water Congress of the IWA in Paris, conference reprint*, **6**, 130-137.
- 6) Siegrist, H., Reithaar, S., Koch, G. and Lais, P. (1998) Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon, *Wat. Sci. Tech.*, **28**(8-9), 241-248.
- 7) Koch, G., Egli, K., Van der Meer, J.R. and Siegrist, H. (2000) Mathematical modeling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contactor, *Wat. Sci. Tech.*, **41**(4-5), 191-198.
- 8) Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., Van der Meer, J.R. and Zehnder, A.J.B. (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate, *Arch. Microbiol.*, **175**, 198-207.
- 9) Dalsgaard, T., Canfield, D.E., Petersen, J., Thamdrup, B.O. and Acuna-Gonzalez, J. (2003) N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica, *Nature*, **422**, 606-608.
- 10) Kuypers, M.M.M., Sliemers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B.O.B., Kuenen, J.G., Damste, J.S.S., Strous, M. and Jetten, M.S.M. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea, *Nature*, **422**, 608-611.
- 11) Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 589-596.
- 12) Mobarry, B., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E. and Stahl, D.A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(6), 2156-2162.
- 13) Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D.J. and Arciero, D.M. (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, **71**, 59-67.
- 14) Spieck, E., Aamand, J., Bartosch, S. and Bock, E. (1996) Immunocytochemical detection and location of the membrane-bound nitrite oxidoreductase in cells of *Nitrobacter* and *Nitrospira*, *FEMS Microbiology Letters*, **139**, 71-76.
- 15) Hoshino, T., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A. and Inamori, Y. (2001) Direct detection by in situ PCR of the *amoA* gene in biofilm resulting from a nitrogen removal process, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(11), 5261-5266.
- 16) Aoi, Y., Masaki, Y., Tsuneda, S. and Hirata, A. (2004) Quantitative analysis of *amoA* mRNA expression as a new biomarker of ammonia oxidation activities in a complex microbial community, *Letters in Applied Microbiology*, **39**, 477-482.
- 17) Potter, T.G., Tseng, C. and Koopman, B. (1998) Nitrogen removal in a partial nitrification/complete denitrification process, *Water Environmental Research*, **70**(3), 334-342.
- 18) Verstraete, W. and Philips, S. (1998) Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts, *Environmental Pollution*, **102**(1), S1, 717-726.
- 19) Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1998) The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water, *Wat. Sci. Technol.*, **37**(9), 135-142.
- 20) Kuai, L., and W. Verstraete. 1998. Ammonium removal by the Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4500-4506.
- 21) Abeliovich, A. and Vonshak, A. (1992) Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*, *Arch. Microbiol.*, **158**, 267-270.
- 22) Pynaert, K., Smets, B.F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S.D. and Verstraete, W. (2003) Characterization of an Autotrophic Nitrogen-Removing Biofilm from a Highly Loaded Lab-Scale Rotating Biological Contactor, *Appl. Environ. Microbiol.*

Microbiol. **69**, 3626-3635.

- 23) Poth M. (1986) Dinitrogen production from Nitrite by *Nitrosomonas* Isolate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**(4), 957-959.
- 24) Bock,E., Schmidt,I., Stuvén,R. and Zart,D. (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor, *Arch.Microbiol.*, **163**, 16-20.
- 25) Schmidt,I. And Bock,E. (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*, *Arch.Microbiol.*, **167**, 106-111.
- 26) Zart,D. and Bock,E. (1998) High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermenter with complete biomass retention in the presence of gaseous NO₂ or NO, *Arch Microbiol.*, **169**, 282-286.
- 27) Amaral,J.A., Archambault,C., Richards,S.R. and Knowless,R. (1995) Denitrification associated with groups I and II methanotrophs in a gradient enrichment system, *FEMS Microbiology and Ecology*, **18**, 289-298.
- 28) Pel,R., Oldenhuis,R., Brand,W., Vols,A., Gottschal,J.C. and Zwart,K.B. (1997) Stable isotope analysis of a combined nitrification-denitrification sustained by thermophilic methanotrophs under low-oxygen conditions, *Applied Environmental Microbiology*, **63**, 474-481.
- 29) Broda E. (1977) Two kinds of lithotrophs missing in nature, *Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie*, **17**(6), 491-493.
- 30) Van de Graaf A.A., Mulder A., Slijkhuys H., Robertson L.A. and Kuenen J.G.T. (1990) Anoxic ammonium oxidation, *Proc.5th European Congress on Biotechnology*, **1**, 388-391.
- 31) Van de Graaf, A.A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. (1997) Metabolic Pathway of anaerobic oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor, *Microbiology*, **143**, 2415-2421.
- 32) Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R.I., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete, *Nature*, **400**, 446-449.
- 33) Strous, M. (2000) Microbiology of anaerobic ammonium oxidation, PhD Thesis, Delft, The Netherlands, Delft University Press, ISBN 90-9013621-5.
- 34) Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J.W., Shleifer, K.H. and Wagner, M. (2000) Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation, *System. Appl. Microbiol.*, **23**, 93-106.
- 35) Schmid,M., Maars,B., Dapena,A., Van de Pas-schoonen,K., Van de Vossenbergh,J., Kartal,B., Van Niftrik,L., Schmidt,I., Cirpus,I., Kuenen,J.G., Wagner,M., Sinninghe Damste,J.S., Kuypers,M., Revsbech,N.P., Mendez,R., Jetten,M.S.M. and Strous,M. (2005) Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(4), 1677-1684.
- 36) Van Niftrik,L.A., Fuerst,J.A., Sinninghe Damste,J.S., Kuenen,J.G., Jetten,M.S.M. and Strous M. (2004) The anammoxosome: intracytoplasmic compartment in anammox bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, **233**, 7-13.
- 37) Sinninghe Damste,J.S., Strous,M., Rijpstra,W.I.C., Hopmans,E.C., Geenevasen, J.A.J., van Duin,A.C.T., van Niftrik,L.A. and Jetten,M.S.M. (2002) Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane, *Nature*, **419**, 708-712.
- 38) Schalk J., Vries,S., Kuenen,J.G. and Jetten M.S.M. (2000) Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation, *Biochemistry*, **39**, 5405-5412.
- 39) Van de Graaf A.A., de Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M. and Kuenen J.G. (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor, *Microbiology*, **142**, 2187-2196.
- 40) Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J.G. and Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(6), 2446-2448.
- 41) Strous M., Kuenen J.G. and Jetten M.S.M. (1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(7), 3248-3250.
- 42) Strous, M., Van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J.G. and Jetten, M. (1997) Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations, *Wat. Res.*, **31**(8), 1955-1962.

43) 川瀬義矩、生物工学の基礎、化学工学社(東京)p.129

44) 山根恒夫、生物反応工学、産業図書株式会社

第2章 Anammox微生物の集積培養

第1節 概説

Anammox反応をつかさどる微生物は1999年に*Planctomycete*の一種であると同定され、その後も数種類のAnammox微生物が存在すること、またこの微生物が環境中に広く存在し、窒素代謝に大きく貢献している可能性が示唆されつつある^{1~3)}。しかし、これまでの研究報告は主に生物膜を有する処理プラントにおいてAnammox様反応を確認したために集積培養を試みたものが多く、活性汚泥からの回分培養によるAnammox微生物の集積培養は難しいとされている^{4~11)}。その理由として、Anammox微生物はNH₄-NとNO₂-Nを基質とするという性質の他に、倍加時間が約11日と増殖速度が非常に遅い、酸素への暴露により障害を受けるといった性質を有することが挙げられる¹²⁾。完全な無酸素条件が求められ、かつ他の微生物の反応により基質濃度や培養条件が変わることに対応しなければならない。そして濃度変化が得られる程度にAnammox微生物を増殖させるためには相当の時間を有し、存在の有無を判断するのが難しい。

上記の特徴を考慮すれば、Anammox微生物が増殖するのに適した環境は、長い固形物滞留時間(SRT: solid retention time)が確保できる、基質となる窒素化合物が存在する、無酸素条件のある場所と考えられる。これまでAnammox微生物の存在が報告されている水処理系は、回転円盤や流動床等の生物膜システムが主であり、これらの条件を満たしている。我々は、長いSRT、アンモニアと亜硝酸の共存、無酸素という条件を満たしていれば、活性汚泥中にもAnammox微生物が存在すると考え、活性汚泥からの本微生物の集積培養を試みた。本章の目的は、活性汚泥からのAnammox微生物の集積培養方法を示すとともに、16S rDNA解析による系統解析結果から、活性汚泥中の複数のAnammox微生物の存在と、その系統的な位置付けを示すことである。

第2節 実験方法

2-2-1 活性汚泥の選定

最初の試みとして、最も一般的な汚泥と考えられる下水汚泥とし尿処理汚泥を混合したものを種汚泥として選定した。この汚泥は運転方法等は特に考慮せず、実際の処理場から採取した。次の試みとして、Anammox微生物のNH₄-NとNO₂-Nを基質とする性質から、硝化/脱窒プロセスを有する排水処理プラントに着目した。また、その成育速度の遅さを考慮し、SRTの長い運転が行われ、酸素が無く、アンモニアと亜硝酸が共存するというAnammoxに適した環境を有していると予想される4つの排水処理プラントの活性汚泥を種汚泥に用いた。各処理プラントの運転条件をTable 2-1に示す。汚泥Aは硝酸廃液をメタノール添加により処理する脱窒プラントから、汚泥Bはアンモニアと硝酸を主要な処理対象とする工業廃水の処理プラントから、汚泥Cは養豚排水と家庭排水の混合液を処理する、間欠曝気により硝化を行う硝化脱窒プラントから、汚泥Dはし尿処理プラントから採取した。汚泥Eは汚泥Aと同じプラントから採取したが、SRTが約10日に変更されていた。

Table 2-1 The characteristics of the wastewater treatment plants for source of test sludges

| Sludge | Type of wastewater treatment plant | SRT |
|--------|---|------------------------|
| A | Denitrification sludge from industrial wastewater treatment plant | Approximately 1 month |
| B | Nitrification + Denitrification sludge from industrial wastewater treatment plant | Longer than 1 month |
| C | Intermittent Nitrification + Denitrification sludge from piggery wastewater and domestic wastewater treatment plant | Approximately 2 months |
| D | Sludge from night soil treatment plant | Longer than 1 month |
| E | The same plant as sludge A | Approximately 10 days |

2-2-2 培養方法

下水汚泥＋し尿処理汚泥を種汚泥として、循環ラインを設けた容積80Lのリアクターを用いて、最初の78日間は連続培養、その後162日間は回分培養を行った。リアクター図をFig.2-1に示す。リアクター本体には攪拌のためのモーターとレーキを設置し1回/分で攪拌した。汚泥と空気との接触を避けるため、処理水およびガス出口は亜硫酸ナトリウムを含む水で水封した。2系列の運転を行い、電子供与体と電子受容体の組合せを系列ⅠはNH₄-NとNO₂-N、系列ⅡはNH₄-NとNO₃-Nとした。連続培養時のHRTは1日、pH7.2～8.8、温度はウォータージャケットによりAnammox活性が高いとされる範囲内の30～34℃に維持した。次に、容量20Lのカラムに汚泥を移してFill&Draw方式で培養した。液量14L、4時間毎に5分間窒素曝気することにより攪拌を行い、温度は35℃に設定した。HRTは24.5日とした。

汚泥A～Eについては、微生物の流出を防ぐために回分式培養を行った。採取した汚泥は、有効体積1Lの密閉フラスコの気相部に窒素ガスを充填し、NH₄-NとNO₂-N（汚泥EはNH₄-N、NO₂-N、NO₃-N）を含む無機合成培地を用いて培養した。培地の組成をTable 2-2に、培養装置図をFig. 2-2に示す。NH₄-N、NO₂-Nが消費された場合には、(NH₄)₂SO₄溶液、NaNO₂溶液を添加した。また、部分的に新しい培地に交換する操作も行った。フラスコは発生ガスを収集するシリンジを有しており、このシリンジに充填した窒素ガスと置換してサンプルを採取し、直ちに0.45 μmのフィルターでろ過後分析に供した。温度条件は30℃とした¹¹⁾。また、Anammox微生物は細胞濃度が10¹⁰～10¹¹ cell/ml以上の場合のみ活性を示したという既報の知見から、激しい攪拌を避け、基質を拡散する目的で一日に1～2回手動で攪拌した¹⁾。また1N H₂SO₄、1N NaOHによりpHを7.0～8.5に調整した。

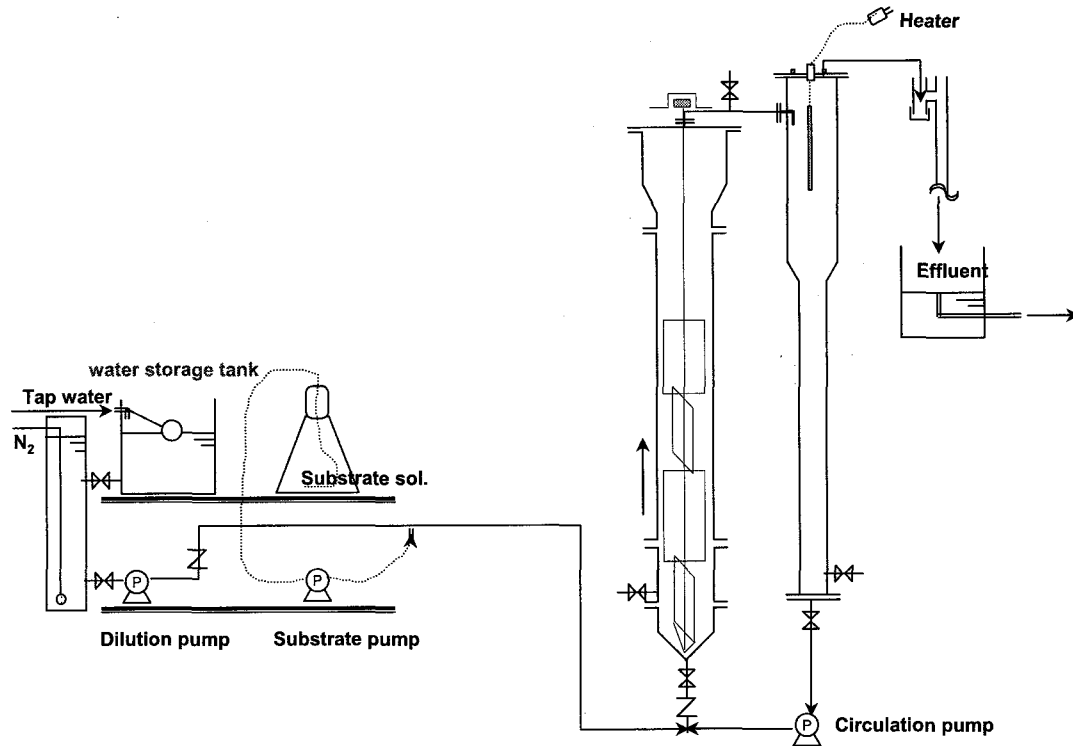


Fig. 2-1 Experimental device for continuous cultivation of the mixture of activated sludge from sewage-treatment plant and night soil treatment plant

Table 2-2 Composition of medium for cultivation

| | | | |
|---|-------------|---|-------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 118 ~ 566mg | | |
| NaNO ₂ | 123 ~ 591mg | | |
| NaNO ₃ | 121 ~ 182mg | | |
| KHCO ₃ | 500mg | | |
| KH ₂ PO ₄ | 27.2mg | | |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 180mg | | |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 120mg | | |
| Trace element I | 1ml | | |
| Trace element II | 1ml | | |
| Water | 1l | | |
| Trace element I (g/L) | | | |
| EDTA | 5 | | |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 9.14 | | |
| Trace element II (g/L) | | | |
| EDTA | 15 | NaMoO ₄ · 2H ₂ O | 0.22 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.43 | NiCl ₂ · 6H ₂ O | 0.19 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.24 | NaSeO ₄ · 10H ₂ O | 0.21 |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.99 | H ₃ BO ₄ | 0.014 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.25 | | |

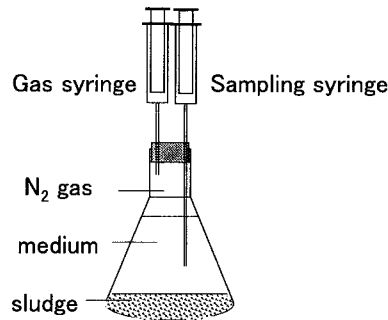


Fig. 2-2 Experimental device for batch cultivation

2-2-3 16S rDNA解析

汚泥Aについては、同じ汚泥を培養した別のリアクターからDNAを抽出して16S rDNAの解析を行い、その結果を採用した¹³⁾。汚泥Cについては、フラスコ中の汚泥のDNAを抽出し、PCRにより全長16S rDNAを増幅、増幅された16S rDNAをプラスミドベクターへクローニングしてクローンを取得し、遺伝子シーケンシングにより塩基配列を決定した。DNA抽出にはISOPLANT Kit (ニッポンジーン) を使用した。全長16S rDNAの増幅には、プライマーに16S-5'II (5'-TGGCGGCGTGGTTTAGGC-3')と16S-3' (5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3') を用いた。プライマーはPlanctomyceteに属する菌の、AB015552、AF202655、AF202659、AJ131819、AJ250882 (全てAccession Number) のデータベースを比較し、保存されている部分を選んだ。16S-5'IIプライマーはAB015552の30bp~47bpの部分とした。16S-3'プライマーはAJ250882の1534bp~1551bpの部分の相補的なものとして設計した。PCR条件は、pre-heating;94°C、2分に続き、第1段階;94°C、15秒、第2段階;55°C、2秒、第3段階;68°C、1分を40サイクル繰り返した。PCR産物はpBluescript KS (+) (Toyobo)のHinc IIサイトに挿入し、構築されたプラスミドは*E. coli* XL1-Blue (Stratagene) competent cellsを形質転換してクローンを取得した。得られたクローンからDNAを抽出し、遺伝子シーケンシングによる解析を行った。

得られたそれぞれの塩基配列を、インターネット上で遺伝子データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録された塩基配列と比較し、Clustal W¹⁴⁾ により系統解析を行い、Treeview¹⁵⁾ により系統樹を作成した。

2-2-4 化学分析

NH₄-Nは比色法¹⁶⁾、NO₂-NとNO₃-Nはイオンクロマトグラフ(ICS-A23, Yokogawa)により測定した。汚泥のタンパク濃度はFolin-Ciocalteu's試薬を用いたLowry法により測定した。

第3節 実験結果および考察

2-3-1 下水汚泥+し尿処理汚泥の培養結果

培養結果をFig.2-3に示す。

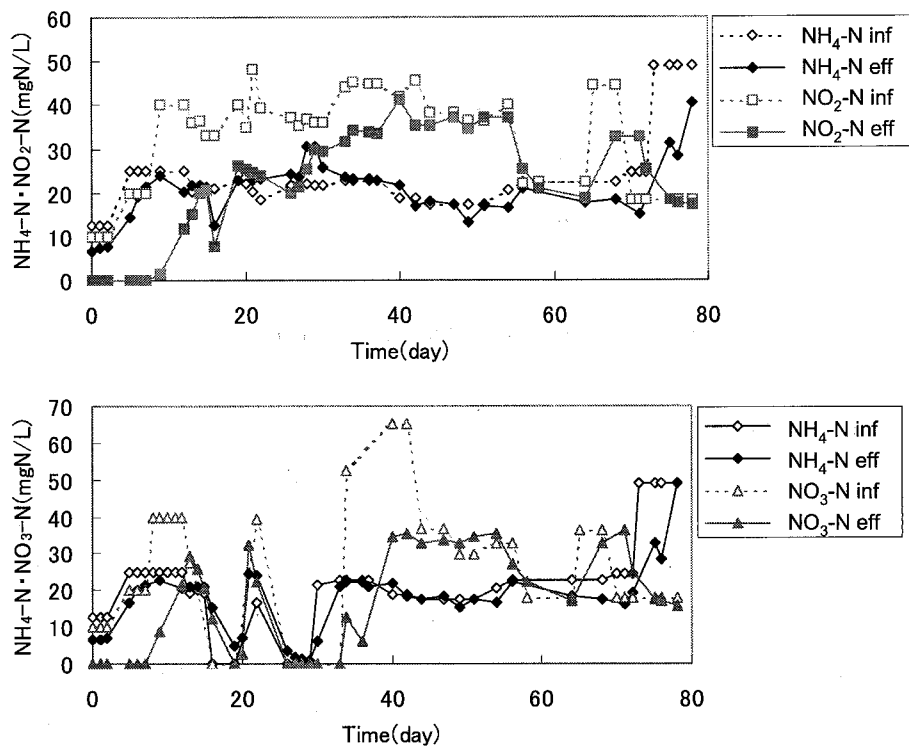


Fig. 2-3 The change of nitrogen concentration during first 78 days of continuous cultivation

NO_x の消費量が減り、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の除去が見られ始めたことから、反応確認のため流入を停止し、回分培養形式とした。系列I、IIともに培養液中の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が 2mgN/L 以下になると再度 NaNO_2 液を添加した。濃度変化をFig.2-4に示す。

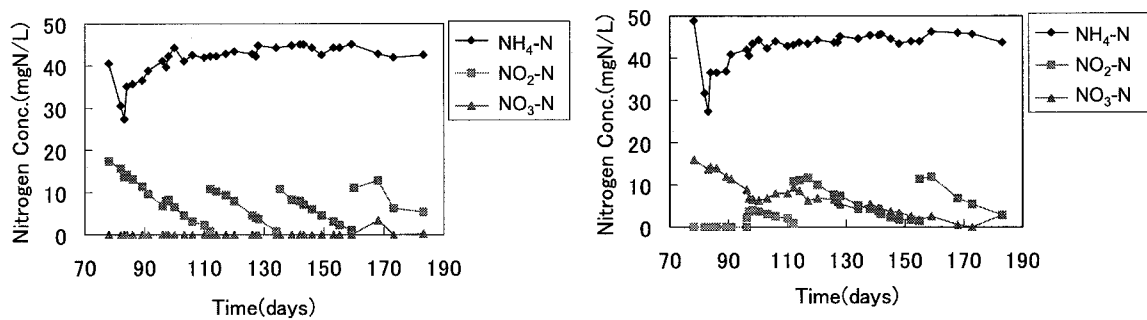


Fig. 2-4 The change of nitrogen concentration during 78-182 days of batch cultivation

$\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は最初の数日は減少したが、その後増加に転じた。100日まで継続して上昇し、その後はほとんど変化しなかった。 NO_x は消費傾向が続いたが、この消費は2系列共に自己分解に伴う従属栄養細菌による脱窒反応のためと考えられる。

汚泥を20Lカラムに移しFill&Draw型式で培養した時の窒素除去速度をFig.2-5に示す。

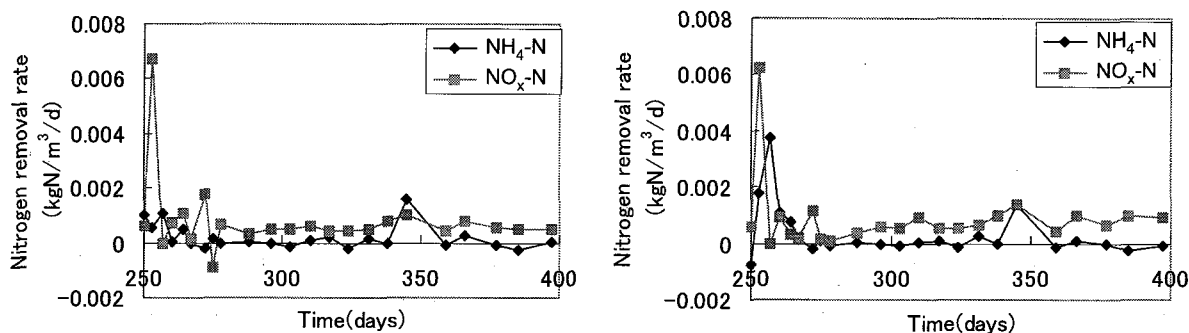


Fig. 2-5 Changes of nitrogen removal rate during 240-400 days of fill & draw cultivation

NH₄-Nの除去速度は数回正の値を示したが、実験期間を通してほとんど0付近から大きく変化しなかった。2系列共に345日目に長時間の窒素曝気を行ったため、345日目のNH₄-N除去速度はストリッピングの効果であると推察される。系列I、II共にNO₂-Nはほぼ一定 ($0.8 \times 10^{-3} \text{kgN/m}^3/\text{d}$) の消費速度を示した。培養開始から1年以上合成無機培地のみを与えてきたため、有機物を基質として生育する汚泥中の微生物の自己分解はほとんど終了していると思われるが、NH₄-Nがわずかに増加する日もあることから、まだわずかな自己分解が起こっており、NO₂-Nの消費はそれに伴う従属栄養細菌による脱窒反応によるものと考えられる。400日経過後にもNH₄-Nの消費が上昇してこないことから、この汚泥中にはAnammox微生物は存在していないと結論付けた。

2-3-2 硝化脱窒汚泥の培養結果

汚泥A~Dの培養液中のNH₄-NとNO₂-Nの濃度変化をFig. 2-6に示す。培養後約80日間は、汚泥A~Dの全ての汚泥培養液中のNH₄-N濃度は増加し、NO₂-N濃度は減少した。NH₄-Nは供試汚泥中の微生物の自己分解により生成され、NO₂-Nは自己分解によって生じた有機物を用いた従属栄養細菌による脱窒反応により除去されたと推察される。NH₄-N濃度の増加速度、NO₂-N濃度の減少速度は経時的に小さくなる傾向がみられた。これは自己分解が進むことにより自己分解する微生物の存在量が徐々に減少したためと推察される。その後NH₄-N濃度はほぼ横這いとなり、培養開始後92日後に汚泥A、84日後に汚泥Cにおいて、初めて培養液中のNH₄-N濃度の減少が観察された。しかし、汚泥B、汚泥D、および汚泥Eの培養液中NH₄-N濃度は100日以上経っても増加し続けた。そこで汚泥Aと汚泥Cを新しい培地に入れ替えて培養を継続したところ、両汚泥ともにNH₄-NとNO₂-Nを同時に除去し、NO₃-Nを生成した。この後NH₄-NおよびNO₂-Nの除去速度、NO₃-Nの生成速度は経時的に上昇した。

汚泥Aと汚泥CのNH₄-NとNO₂-Nの除去速度およびNO₃-Nの生成速度の経時変化グラフをFig. 2-7に示す。横軸の0日はAnammox反応開始日、すなわちアンモニアの低下が初めて確認された日を示す。NH₄-NとNO₂-Nの除去速度およびNO₃-Nの生成速度は経時的に上昇し、Anammox活性を有する微生物の増殖が示唆された。Fig. 2-7に示した除去速度から算出した、1モルのNH₄-N除去に対するNO₂-N除去量とNO₃-N生成量の割合は、汚泥A、汚泥C各々1.14 : 0.19, 1.20 : 0.19であった。報告されているAnammox反応式の値である1.32 : 0.26よりわずかに低い値となったのは、残存する微生物の自己分解によって生じる有機物を用いた従属栄養細菌による脱窒反応のためにNO_xが消費されたことが原因であると推察される。

培養初期においては、Anammox微生物以外の生物体の自己分解がリアクター内の主要な反応になると考えられる。供試汚泥中にわずかなAnammox微生物が存在しても、そのわずかな微生物が起こす

$\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ の除去は、自己分解による $\text{NH}_4\text{-N}$ 生成と、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の無酸素還元完全にマスクされてしまう。したがって、Anammox微生物による $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ の同時除去を確認するためには、自己分解による $\text{NH}_4\text{-N}$ の生成が無視できるようになるまで培養を継続する必要があると言える。しかし、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の生成が少なくなっても汚泥B、D、Eのように低下に転じない場合には、元の汚泥にAnammox微生物が存在していなかったと考えるのが妥当と思われる。

汚泥Aを採取した同じプラントで、SRTを約10日に変更した後に採取した汚泥Eでは $\text{NH}_4\text{-N}$ の除去が観察されなかったことから、供試汚泥の選択に際しては長いSRTを有することが必要条件であると言える。

集積の度合いを比較するために、Anammox反応確認後約1年間の培養後に、汚泥タンパクあたりの $\text{NH}_4\text{-N}$ の除去速度を、報告された値と比較した¹⁷⁾。両方の汚泥に対する値をTable 2-3に示す。汚泥Aと汚泥Cの値は近いものであったが、既報の値の約3.2~3.5分の1であった。したがって、1年の培養後であっても、培養汚泥中のAnammox微生物の存在割合は低いことが示唆された。Anammox微生物の増殖速度が遅いことに加え、回分培養であるために、細胞代謝物の有機成分が系外へ排出されず従属栄養細菌の増殖が継続し、相対的にAnammox微生物の割合が低くなるのではないかと考えられる。

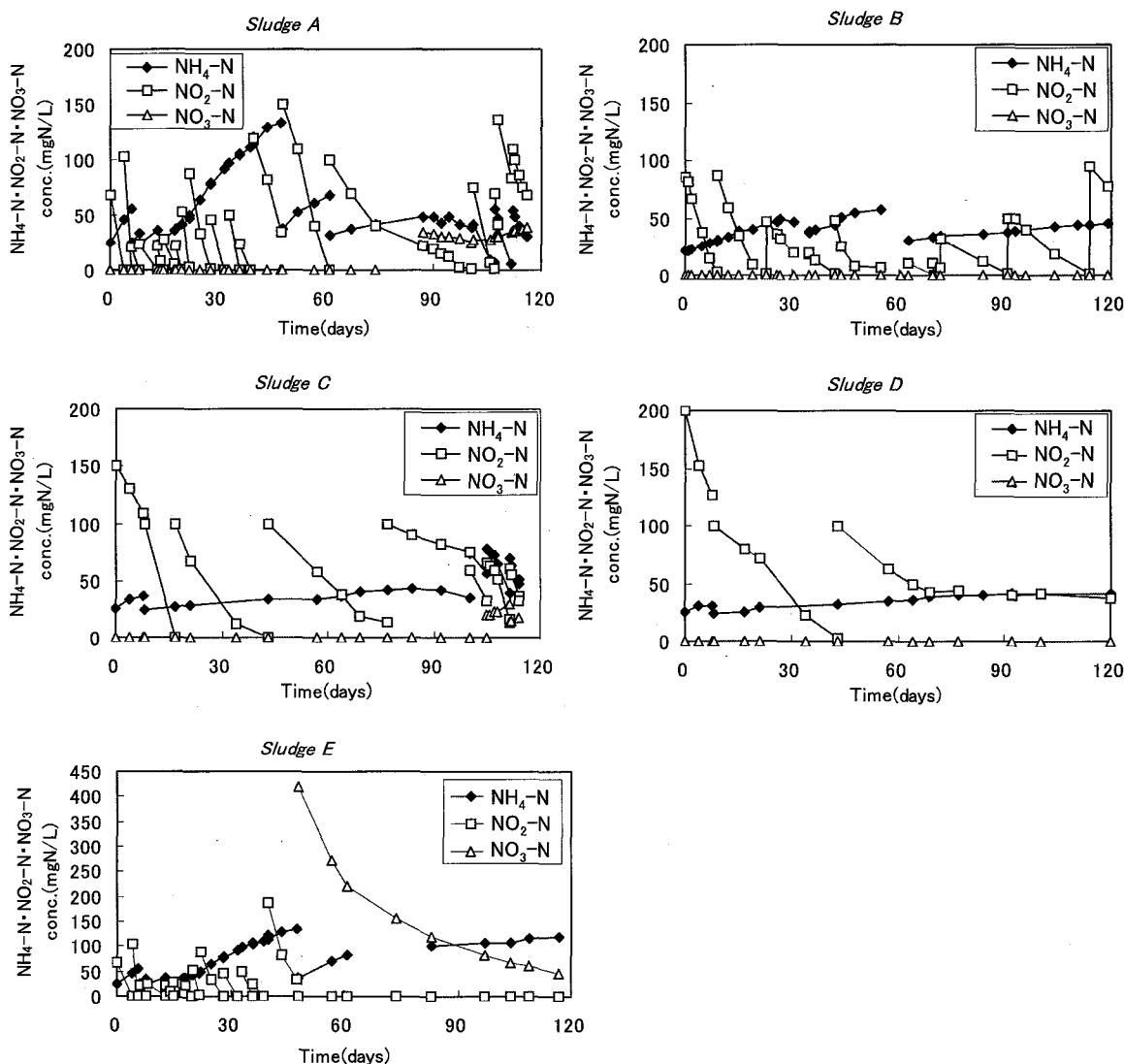


Fig. 2-6 Changes of nitrogen concentration during 120 days of cultivation

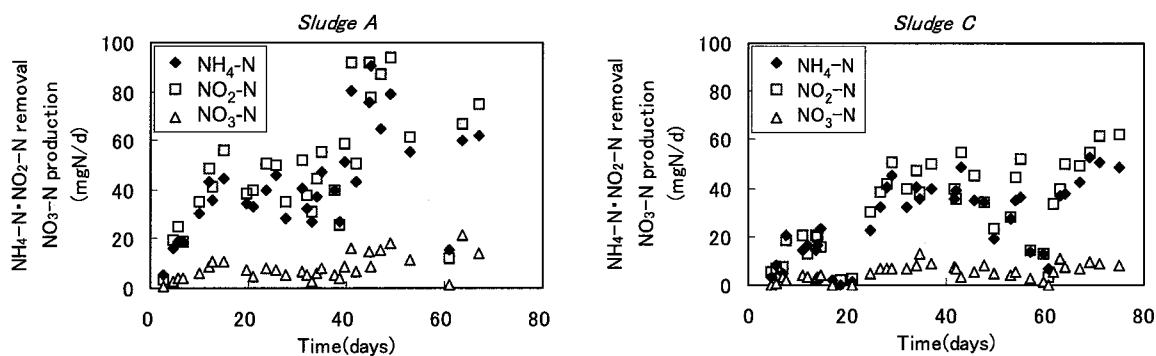


Fig. 2-7 Changes of ammonium and nitrite removal rate and nitrate production rate after the detection of ammonium removal

Table 2-3 Specific ammonium conversion rate for two acclimated sludges

| Sludge | Specific ammonium conversion rate (g NH ₄ -N/g Protein/d) |
|--|--|
| Sludge A | 0.260 |
| Sludge C | 0.281 |
| Reported microorganism (Strous <i>et al.</i> , 1998) | 0.907 |

2-3-3 Anammox反応の確認

汚泥Aの反応をより詳細に観察するために、汚泥を一部採取して回分培養を行った。実験条件をTable 2-4に、測定項目および方法をTable 2-5に示す。実験は同条件で2系列行った。

Table 2-4 Experimental conditions

| | |
|---------------------|---|
| Experimental period | 23 days |
| Seed sludge | Sludge A Initial VSS concentration: 7.0mgVSS/L (4.2mgProtein/L) |
| Substrate | Initial concentration: NH ₄ -N 28mgN/L, NO ₂ -N 35mgN/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , NaNO ₂ solution was added when consumed |
| Device | 125mL vial Medium 100mL, sludge solution 10mL, Total 110mL (at the start of cultivation) |
| Condition | 30°C, static culture, dark condition |
| Sampling | 1time/day, 1ml sample was replaced to dinitrogen gas after agitation Filtered with 0.45 μ m filter paper |

Table 2-5 Measurement items and its methods and frequency

| Measurement item | Method | Frequency |
|--|--|------------------|
| NH ₄ -N | Colorimetric method(Indophenol method) | 1 time/day |
| NO ₂ -N, NO ₃ -N | Ion chromatograph | // |
| PO ₄ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ | Ion chromatograph | // |
| Protein | Lowry's method | At start and end |
| pH | pH meter (TOA) | // |
| IC | TOC analyzer (SHIMAZU) | // |

二系列の濃度変化をFig.2-8に示す。

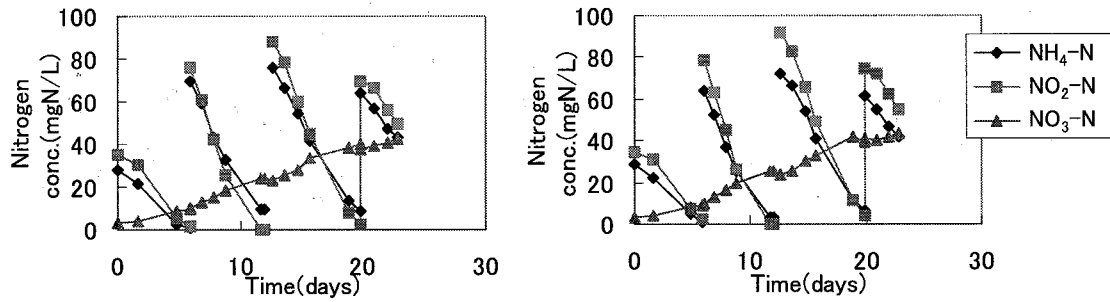


Fig.2-8 Changes of ammonium, nitrite and nitrate concentration (left: series A, right: series B)

$\text{NH}_4\text{-N}$ ・ $\text{NO}_2\text{-N}$ は実験開始直後から消費された。実験期間中消費された $\text{NH}_4\text{-N}$ ・ $\text{NO}_2\text{-N}$ を補うため、塩化アンモニウムおよび亜硝酸ナトリウム溶液を計3回添加した。 $\text{NO}_3\text{-N}$ は一定して増加傾向を示した。基質律速となり速度が低下した後に基質を添加した際には、2~3日後に速度の最大値を示した。また、除去速度は徐々に低下する傾向がみられた。

$\text{NH}_4\text{-N}$ の消費量に対する $\text{NO}_2\text{-N}$ 消費量、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 生成量の比をFig.2-9に示す。明らかに外れる点(図中○)を除いた平均値は $\text{NO}_2\text{-N}/\text{NH}_4\text{-N}=1.31$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}/\text{NH}_4\text{-N}=0.24$ であり、報告されている反応式(1-1)(第1章第1節参照)の値1.32、0.26と非常に近い値であった。

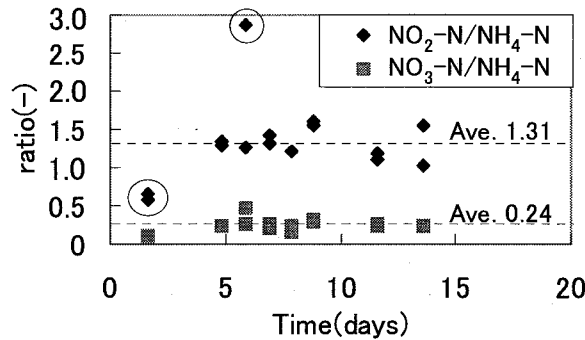


Fig.2-9 Ratio of $\text{NO}_2\text{-N}$ removal and $\text{NO}_3\text{-N}$ generation to $\text{NH}_4\text{-N}$ removal

初期汚泥濃度と収率から菌体濃度を算出し、その値から増殖速度を計算した。初期汚泥濃度はタンパク濃度測定値から換算した 7.0 mgVSS/L 、収率は $0.066 \text{ molC/molNH}_4\text{-N}$ を用いた³⁾。

$$Y = 0.066 \text{ molC/molNH}_4\text{-N} = 0.121 \text{ mgVSS/mgN} \quad (2-1)$$

(Biomass = $\text{CHO}_{0.5}\text{N}_{0.15}\text{S}_{0.05}$ とする)

対数値のグラフをFig.2-10に示す。計算による実験終了時の汚泥濃度はA: 21.71 , B: 21.39 mgVSS/L 、測定タンパク濃度から換算した汚泥濃度はA: 24.62 , B: 24.58 mgVSS/L であった。グラフより μ はA: 0.0736 (1/d) 、B: 0.0728 (1/d) 、倍加時間はA: 9.42 (d) 、B: 9.52 (d) と計算された。

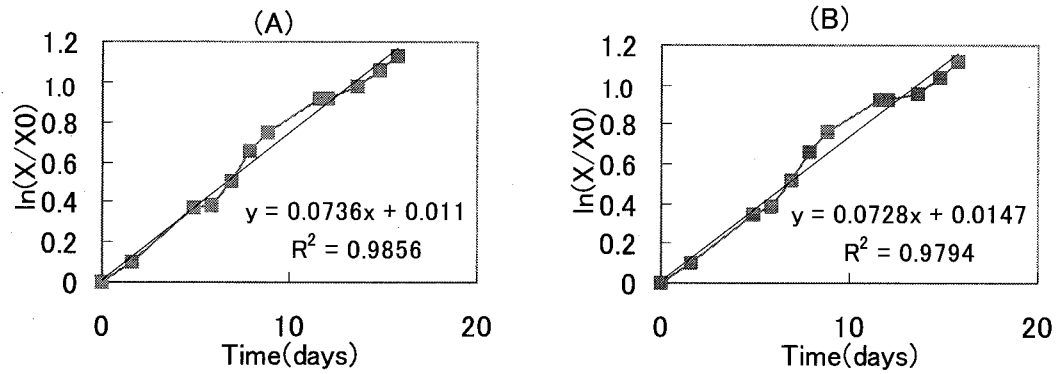


Fig.2-10 Specific growth rate calculated from protein concentration (X:biomass concentration, X_0 :initial biomass concentration)

濃度変化の割合が報告されているeq.1の値とほぼ一致することから、リアクター内の反応はほぼAnammox反応のみとなっていると考えられる。比増殖速度 μ 、倍加時間 t_d は報告されている値 $\mu = 0.0648(1/d)$, $T_d = 11(d)$ と比較するとわずかに大きい値であった。NH₄-N除去速度が低下した原因は、NH₄-N、NO₂-N以外の培地成分の不足か、あるいは反応が進むことによる培養条件の変化 (pH、IC等) が考えられる。IC濃度は実験の終了時にも約50mgC/Lが残存していたため、活性低下の原因はpHであると考え次の実験を行った。

pHの影響を確認するため、基質の添加時にpHを7.2~7.5に調整する場合と、調整を行わない場合との比較を行った。汚泥の初期濃度は13.4~23.2mgVSS/L (8.05~13.93mgProtein/L)、初期NH₄-N 50mg/L、NO₂-N 60mg/Lとし、他の条件はTable 2-4と同じとした。

pHの調整を行った系と、行わなかった2系列の結果をFig.2-11に示す。pH調整を行わなかった系が2系列とも活性値の上昇が数日後に止まったのに対し、pH調整を行った系は実験期間中2点を除いて上昇傾向を示した。

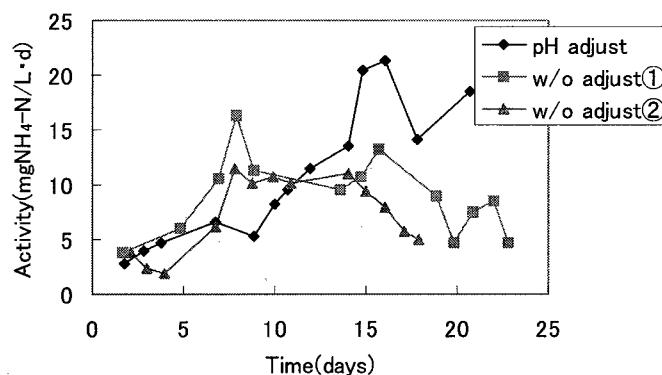


Fig.2-11 Effects of pH adjustment

回分実験で実験終了後に測定したpHの値は、8.5以上 (8.51~9.13) であり、pH調整を行った系列は実験期間中7.20~8.64であったことから、活性低下の原因は反応が進むことによるpHの上昇であり、これを調整することで活性低下を防ぐことができることがわかった。文献によるとバッチ実験の結果で

は最適pHは7.0~8.5であり¹¹⁾、実験はpH 7か8に調整して行われている。

汚泥AのNH₄-N低下確認後2ヶ月の汚泥を光学顕微鏡で撮影した。丸い塊が多く観察でき、それぞれの塊は微小な微生物の集合であるように見える。カバーガラスで強く押しつけてもこの丸い形は容易に崩れず、緻密に凝集していると思われた。さらに走査電子顕微鏡 (SEM) JSM-5500LV (日本電子) で観察したところ、球状の塊が観察でき、それぞれの塊は微小な微生物の集合であった。写真をFig.2-12に示す。この微生物ははくびれを持っており、2~4個に分割されているように見える。この微生物はほぼ全てが凝集した塊で存在していたことから、凝集しやすい特徴的な存在形態を持つと推察される。さらに経時変化を見るため、アンモニア低下確認後12ヶ月、18ヶ月の汚泥のSEM写真をFig.2-13に示す。球状微生物の存在割合が明らかに増加していることから、この微生物がAnammox微生物ではないかと推察される。この微生物の形状は、Anammox反応の認められた流動床のガラスビーズ表面に付着した微生物と似ている¹¹⁾

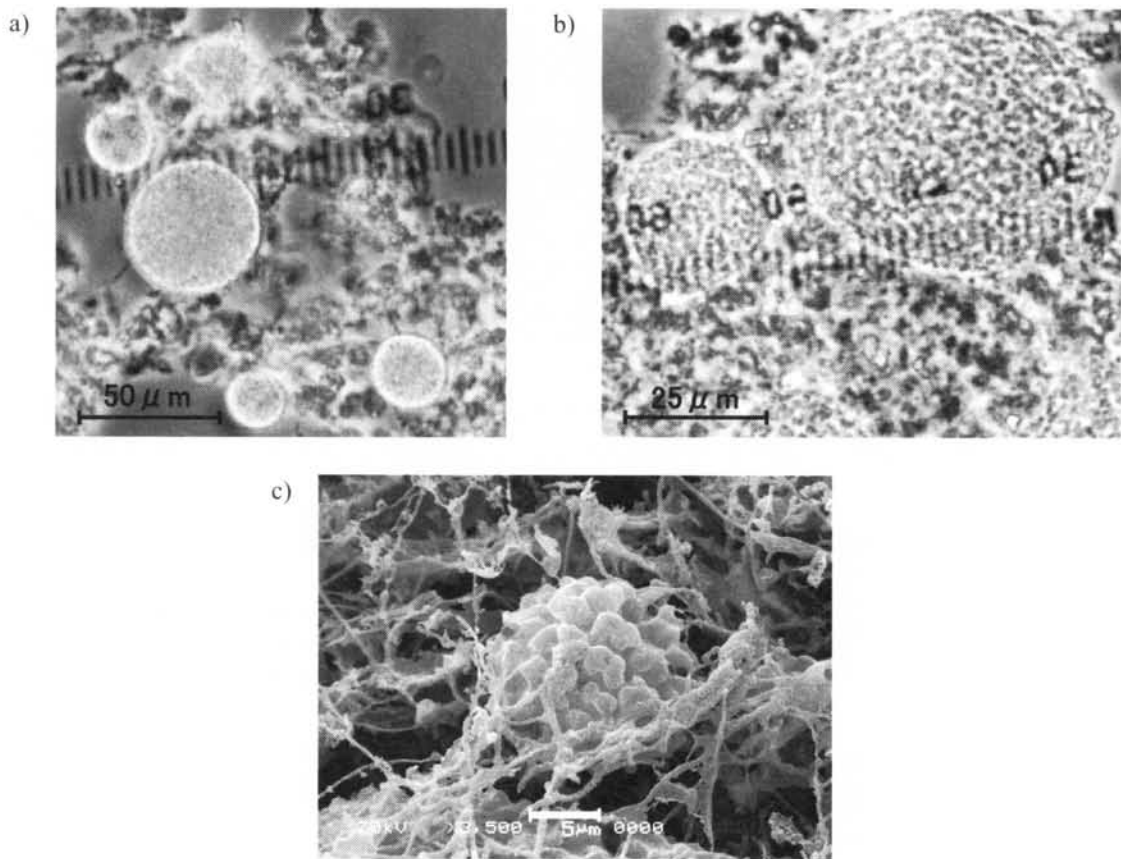


Fig. 2-12 Microscopic observation of sludge A after the detection of ammonium removal, a)×200 (optical microscope), b)×400 (optical microscope), c)×3500 (SEM)

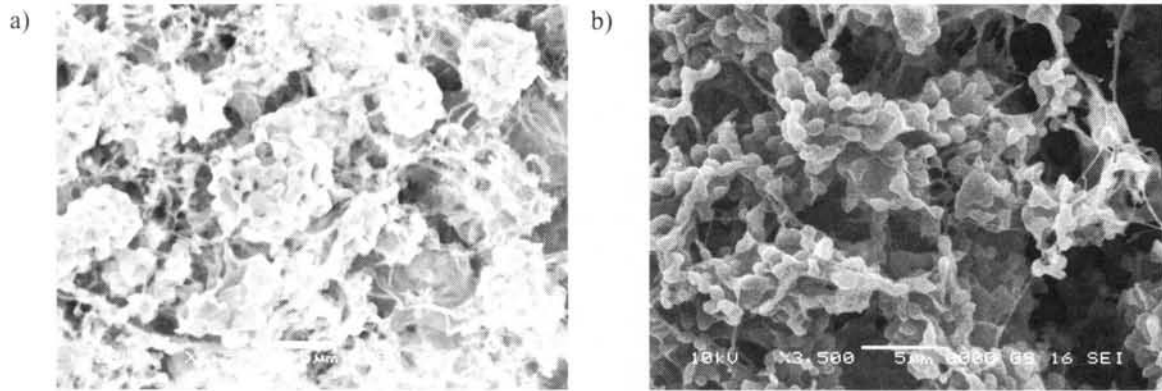


Fig. 2-13 Increase of coccoid cells, a) 12month, b) 18month after the detection of ammonium removal

2-3-4 集積培養した微生物の位置付け

Anammox微生物は*Planctomycete*に属しており、データベース (GenBank) には40を超える種類の塩基配列が登録されている。Fig.2-14は一部の塩基配列のみの登録も含め、Anammox反応を司る微生物として、あるいは近縁の*Planctomycete*として登録されている26種の微生物の関係を示す系統樹である。図中の番号はデータベースのAccession Numberを表す。この中で、初期に同定・命名されたのは *Candidatus Brocadia Anammoxidans* (Accession Number: AF375994)¹⁸⁾、*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*(AF375995他9クローン)¹⁹⁾ である。これら2種類はAnammox微生物の中で異なった系統のグループを形成している。現在では*Candidatus "Scalindua"*という3つ目のグループが確認されている(第1章 1-2-3参照)。集積された汚泥A由来の16S rDNA塩基配列は、*Candidatus Brocadia anammoxidans*に99.2%の塩基の一致が確認され¹³⁾、汚泥C由来の16S rDNA塩基配列は*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*に98.9%の相同性が確認された。したがって、汚泥A、汚泥C由来のAnammox微生物は、系統学的に異なった新規なAnammox微生物であり、国内の排水処理プラント汚泥から2種類の異なったAnammox微生物が集積されたことが明らかとなった。汚泥A由来の微生物をuncultured anoxic sludge bacterium KU1 (AB054006)、汚泥C由来の微生物をuncultured anoxic sludge bacterium KU2 (AB054007) と命名した。

また、日本国内では、熊本県で採取され熊本の地下水を用いて培養された汚泥中にAnammox微生物 KSU-1 (Accession Number: AB057453)が発見されており、同定された2種類の微生物とはまた別の系統に属することが確認された²⁰⁾。これらの結果より、日本国内にも多数種のAnammox微生物が存在することが示された。また、その存在場所は生物膜に限らず、活性汚泥中にも存在することが明らかとなった。

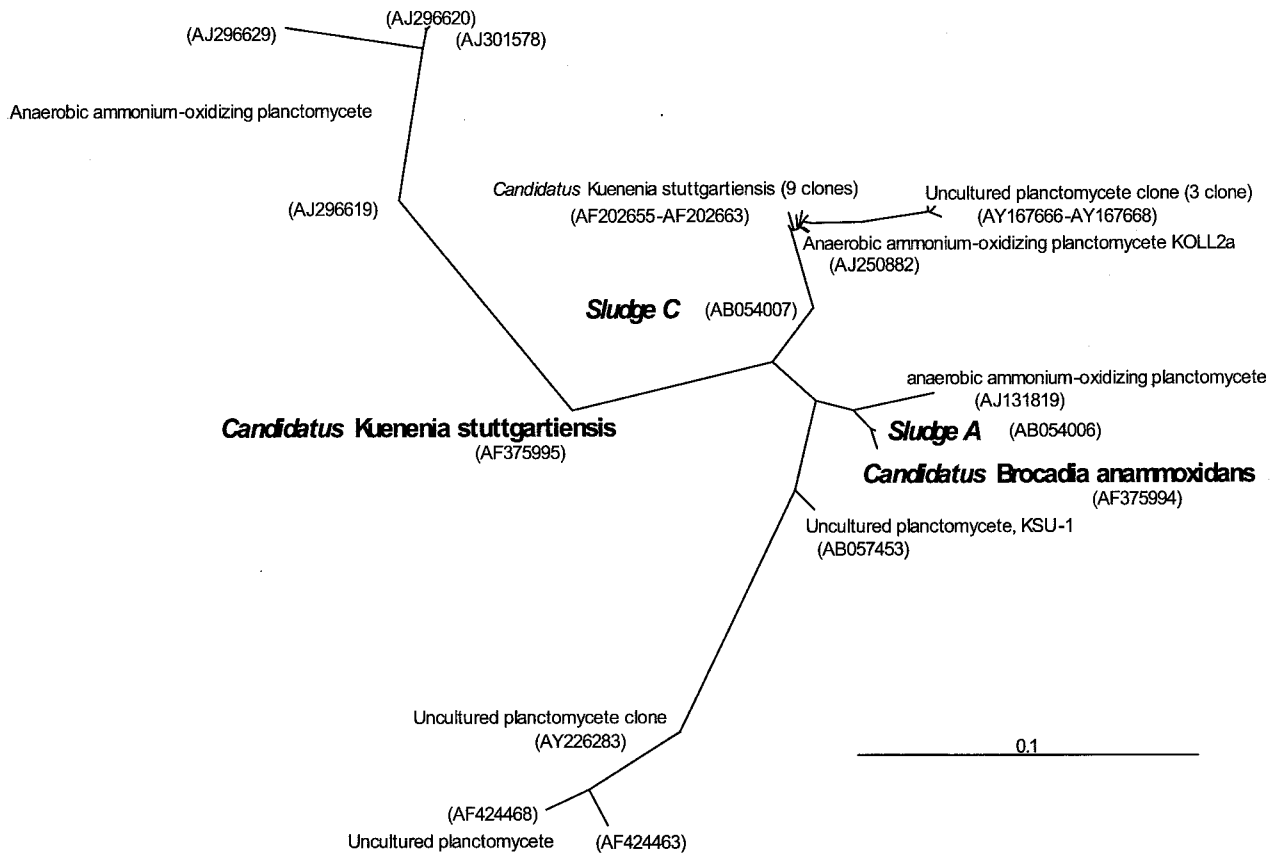


Fig. 2-14 Phylogenetic tree reflecting the relationships of microorganisms having Anammox activity

第4節 結語

活性汚泥から、約3ヶ月間の回分培養によりAnammox活性を検出し、その後の回分培養によりAnammox汚泥を集積培養することができた。下水汚泥とし尿処理汚泥からは1年以上培養後にもAnammox活性は確認できなかったが、2回目の種汚泥の選定では2種類の汚泥からAnammox活性が確認できたことから、長いSRTで運転されている硝化/脱窒プラントの汚泥に着目することがAnammox微生物を探索するのに有効であること、またAnammox反応によるNH₄-Nの減少を検出するためには、自己分解によるNH₄-N生成を終了させるために長い時間を要することが示唆された。活性観察後1年間の培養後にも汚泥あたりNH₄-N除去速度は報告されている値よりも低く、汚泥中のAnammox微生物の割合が低いことが示された。回分培養であるため、生物代謝物が系外へ排出されないためと考えられる。

培養された汚泥の16S rDNA解析により、それぞれの汚泥にはCandidatus Brocadia Anammoxidans、Candidatus Kueneria stuttgartiensisに近縁の、別の系統に属するAnammox微生物（KU-1（Accession No.AB054006）、KU-2（AB054007）と命名）が存在することが確認された。

本研究により、活性汚泥からのAnammox微生物の集積培養が可能であり、国内に複数種のAnammox微生物が存在していることが示された。今後は、本微生物を実際の排水処理に適用するため、培養条件の検討を行うとともに、装置形状の検討を行う。

第 2 章参考文献

- 1) Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., Van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete, *Nature*, **400**, 446-449.
- 2) Dalsgaard, T., Canfield, D.E., Petersen, J., Thamdrup, B.O. and Acuna-Gonzalez, J. (2003) N₂ production by the Anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica, *Nature*, **422**, 606- 608.
- 3) Kuypers, M.M.M., Sliemers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B.O.B., Kuenen, J.G., Damste, J.S.S., Strous, M. and Jetten, M.S.M. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the Black Sea, *Nature*, **422**, 608- 611.
- 4) Van de Graaf, A.A., Mulder, A., De Bruijn, P., Jetten, M.S.M., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(4), 1246-1251.
- 5) Mulder, A., Van de Graaf, A.A., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, *FEMS Microbiology Ecology*, **16**, 177-184.
- 6) Van de Graaf, A.A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. (1997) Metabolic Pathway of anaerobic oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor, *Microbiology*, **143**, 2415-2421.
- 7) Helmer, C., Tromm, C., Hippen, A., Rosenwinke, K.-H., Seyfried, C.F. and Kunst, S. (2000) Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems, *1st World Water Congress of the IWA in Paris, conference reprint*, **6**, 130-137.
- 8) Siegrist, H., Reithaar, S., Koch, G. and Lais, P. (1998) Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon, *Wat. Sci. Tech.*, **28**(8-9), 241-248.
- 9) Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., Van der Meer, J.R. and Zehnder, A.J.B. (2001) Enrichment and characterization of an Anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate, *Arch. Microbiol.*, **175**, 198-207.
- 10) Van de Graaf, A.A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor, *Microbiology*, **142**, 2187-2196.
- 11) Strous, M., Van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J.G. and Jetten, M. (1997) Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations, *Wat. Res.*, **31**(8), 1955-1962.
- 12) Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J.G. and Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(6), 2446-2448.
- 13) Furukawa, K., Rouse, J.D., Imajo, U., Nakamura, K. and Ishida, H. (2002) Anaerobic ammonium oxidation confirmed in continuous flow treatment using a non-woven biomass carrier, *Jpn. J. Wat. Treat. Biol.*, **38**, 87-94.
- 14) Heringa, J. (1999) Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment, *Comput. Chem.*, **15**, 341-364.
- 15) Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers, *Comput. Applic. Biosci. Appl.*, **12**, 357-358.
- 16) 日本下水道協会編 (1997) 下水試験方法, pp.162-163, 東京.
- 17) Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 589-596.
- 18) Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M. and Wagner, M. (2001) 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection, *Environ. Microbiol.*, **3**(7), 450-459.
- 19) Schmid, M., Twachtman, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J.W., Shleifer, K.H. and Wagner, M. (2000) Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation, *System. Appl. Microbiol.*, **23**, 93-106.
- 20) Fujii, T., Sugino, H., Rouse, J.D. and Furukawa, K. (2002) Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a non-woven biomass carrier, *J. Biosci. Bioeng.*, **94**(5), 412-418.

第3章 リアクター形状の検討

第1節 概説

Anammox反応を実際の窒素処理プロセスに適用するためには、Anammox汚泥の窒素除去速度、運転条件など多くの事項を明らかにする必要があるが、まず最も適したリアクター形状を選定することが必要である。生物リアクターの形状には浮遊増殖型、固定床型、流動床型等がある。浮遊増殖型は生物担体が不要であり、最も簡単な設備で実施可能である。しかし、沈殿槽あるいは単一槽の場合には沈殿時間が必要であり、流入SS量が多いと処理に必要な微生物のSRTが確保されず系内に保持できなくなるという欠点を有する。固定床・流動床は微生物を担体表面に固定化するため増殖速度の遅い微生物を利用する場合に適しており、流入SSにも対処可能である。また沈殿槽が不要であるという利点を持つ。負荷は担体表面積に比例するため、一般的に固定床より流動床の方が高い負荷を期待できる。しかし、設備面では装置形状が複雑になり、また流動担体のコストが必要となるという欠点がある。

本研究の目的は、集積培養によって得られたAnammox汚泥を用い、Anammoxプロセスの実用化へ向けて最適なリアクター形状についての検討を行うことである。浮遊増殖型、不織布を担体とした固定床型、プラスチック筒状担体を付着担体とした流動床型の培養装置を用いて長期連続培養を行い、容積負荷、処理の安定性について比較を行った。

第2節 実験方法

3-2-1 種汚泥

種汚泥には、硝酸排水を処理する工業排水処理プラントの脱窒汚泥を回分培養し、Anammox微生物を約1年間集積培養したものを用いた¹⁾。この汚泥の $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度は、 $0.260\text{g NH}_4\text{-N/g Protein/d}$ であった。

3-2-2 実験装置

浮遊増殖型リアクターとして沈殿槽を有しないシーケンシャルバッチ方式の浮遊型リアクター、固定床型リアクターとして不織布を充填した上向流リアクターを用いた。流動床型リアクターとしては、プラスチック筒状担体を付着担体とする上向流リアクターを選択した。Anammox微生物は酸素への暴露により阻害を受けるといった性質が報告されているため、全ての実験において酸素の混入を避けるため、気相部に常時窒素パージを行った²⁾。それぞれのリアクターの運転条件をTable 3-1に、図をFig.3-1に示す。

シーケンシャルバッチリアクターには容量3Lのジャーファーメンターを用いた。レベルセンサーを設置して、基質流入・反応、沈殿、上澄み排出のサイクルを13~40時間、20分、15分に設定した。


固定床リアクターの担体を用いた不織布(日本バイリーン)は、多孔性のポリエステル製で厚さ7mm、径6cmの8枚花卉の菊花状に成型されており、リアクターの運転に先立ちAnammox活性を有する汚泥の懸濁液に浸漬した状態で窒素曝気を約6時間行って汚泥を付着させた。基質はリアクター下部から添加した。処理水の一部を循環させ、上向流速を確保するとともに高濃度亜硝酸による阻害を防いだ³⁾。

筒状担体リアクターの担体には比重1.3、径4mm×高さ4mm、比表面積 $1500\text{m}^2/\text{m}^3$ の筒状プラスチック(筒中プラスチック工業㈱、製品名バイオステージ)を用いた。運転前に担体と汚泥懸濁液を混合した状態で7日間回分培養した。リアクターには不織布リアクターと同じものを用い、基質の添加方法、処理水の循環方法も同様にした。

全ての実験において、基質にはTable 3-2に示す合成培地を用いた。各リアクターの前に設置した前

処理槽において、窒素曝気によりDOを0.2mg/L以下程度に下げた水道水で濃縮合成培地を希釈し、その後炭酸ガスによりpHを7.5に調整した。

Table 3-1 Reactor specification and operational conditions

| | Sequencing-batch reactor | Fixed-bed reactor with nonwoven carriers | Fluidized-bed reactor with tube-shaped attachment carriers |
|-----------------|---|---|--|
| Working volume | 2.4~2.7 L | 20 L (φ 200mm) | 20 L (φ 200mm) |
| Biomass carrier | — | Non-woven Area of non-woven 2.4 m ² | Tube-shaped carriers (φ 4mm, Height 4mm, density 1.3)  Volume of carrier 8 L |
| Influent conc. | NH ₄ -N: 300~750 mg N/L, NO ₂ -N: 270~710 mg N/L | NH ₄ -N: 90~840 mg N/L, NO ₂ -N: 90~980 mg N/L | NH ₄ -N: 90~920 mg N/L, NO ₂ -N: 90~1120 mg N/L |
| HRT | 5.1~15.2 day | 16.2~37.9 h | 16.9~44.0 h |
| Agitation | 45 rpm | 4.0 m/h (Up-flow) | 9.0~9.5 m/h (Up-flow) |
| Temperature | 32 °C | 30 °C | 30 °C |
| Influent pH | 7.5 | 7.5 | 7.5 |

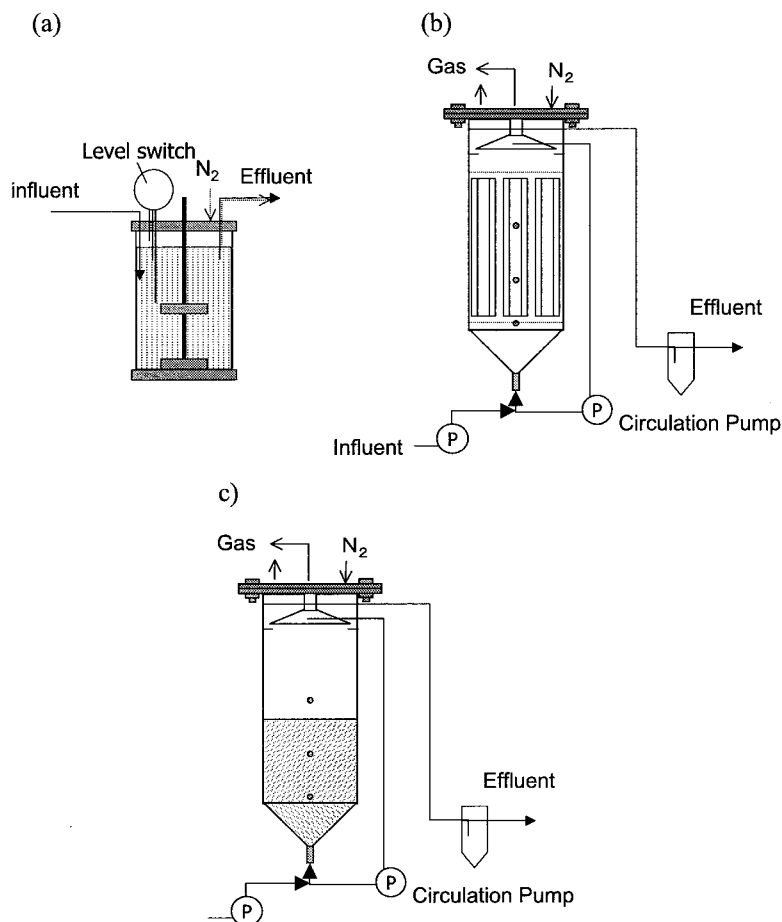


Fig. 3-1 Flow diagram of reactors used for cultivation of anammox sludge; (a) sequencing-batch reactor, (b) fixed-bed reactor with nonwoven carriers, (c) fluidized-bed reactor with tube-shaped attachment carriers

Table 3-2 Composition of medium for cultivation

| | |
|---|--------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 424 ~ 3960mg |
| NaNO ₂ | 444 ~ 4830mg |
| KHCO ₃ | 500mg |
| KH ₂ PO ₄ | 27.2mg |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 180mg |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 120mg |
| Trace element I | 1mL |
| Trace element II | 1mL |
| Tap water | 1L |

Trace element I (g/L)

| | |
|---------------------------------------|------|
| EDTA | 5 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 9.14 |

Trace element II (g/L)

| | | | |
|---------------------------------------|------|---|-------|
| EDTA | 5 | NaMoO ₄ · 2H ₂ O | 0.22 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.43 | NiCl ₂ · 6H ₂ O | 0.19 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.24 | NaSeO ₄ · 10H ₂ O | 0.21 |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.99 | H ₃ BO ₄ | 0.014 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.25 | | |

3-2-3 分析方法

NH₄-Nは下水試験方法(1997)に従い比色法で測定した⁴⁾。NO₂-NおよびNO₃-Nはイオンクロマトグラフ(ICS-A23、Yokogawa)により測定した。タンパク濃度はFolin-Ciocalteu's試薬を用いたLowry法により測定した。

第3節 実験結果および考察

3-3-1 各リアクターの窒素除去速度

Table 3-3に各リアクターにおけるNH₄-N除去量に対するNO₂-N除去量およびNO₃-N生成量の比率の実験期間中の平均値を示す。全てのリアクターにおいて、報告されているAnammox反応の比率に近い値が確認され、リアクター内でAnammox反応が起きていることが示唆された。

Fig.3-2に3種類のリアクターの容積当たり窒素除去速度の経時変化を示す。シーケンシャルバッチリアクターの試験期間中の最大窒素除去速度は0.25 kg N/m³/dであった。開始後33日間は除去速度の上昇が見られたが、35日目に活性が急激に低下し槽内に基質が残留した。槽内を希釈して再度運転を開始したところ再び上昇傾向が見られたが、0.15 kg N/m³/d 付近で上昇傾向が見られなくなった。そこで新たにAnammox微生物を含む汚泥を添加して運転を継続したが、その後も上昇傾向は見られず、一時的な活性低下も見られるなど処理は不安定であった。この間処理水SS濃度は1~8mg/Lであり汚泥の急激な流出はなかった。70日目には汚泥の活性が失われ、その後も数日間低い活性が続いたため、実験を終了した。

不織布リアクターの体積当たり窒素除去速度は200日間ほぼ安定した上昇傾向を示した。運転期間中の最大窒素除去速度は1.55 kg N/m³/d であった。不織布には全体に赤い微生物が付着した。生物膜の厚さは徐々に増加し、150日以降には不織布と不織布の間の一部に目詰まりが生じ、不織布全体が浮上する現象が見られた。Fig.3-3は不織布に赤い汚泥が付着した状態の写真である。

筒状担体リアクター体積当たりの窒素除去速度は100日目まで対数増殖に近い上昇傾向を示したが、その後は緩やかな上昇傾向を示した。運転期間226日間の最大処理速度は2.38 kg N/m³/d であり、試験

期間中窒素除去能力が極端に低下することはなかった。運転期間が長くなるにつれ、筒状担体の浮上が観察された。浮上担体には筒の内部に気泡が見られたことから、Anammox反応により発生した窒素ガスの気泡が筒内部に貯め込まれたために浮上したと考えられる。浮上担体と沈降担体の微生物付着量を比較すると、浮上担体の方が沈降担体より2倍以上多かった (Fig.3-4)。付着量が多くなると窒素ガスの発生量も多くなるため、担体の浮上につながると考えられる。

Table 3-3 Reaction ratio of nitrite removal and nitrate production rate to ammonium removal rate

| | NO ₂ ⁻ removal (-) | NO ₃ ⁻ production (-) | Test period (days) |
|--|---|--|-----------------------|
| Sequencing-batch reactor | 1.04 | 0.18 | 1~74 |
| Fixed-bed reactor with nonwoven carriers | 1.27 | 0.16 | 1~196 |
| Fluidized-bed reactor with tube-shaped attachment carriers | 1.46 | 0.17 | 1~226 |

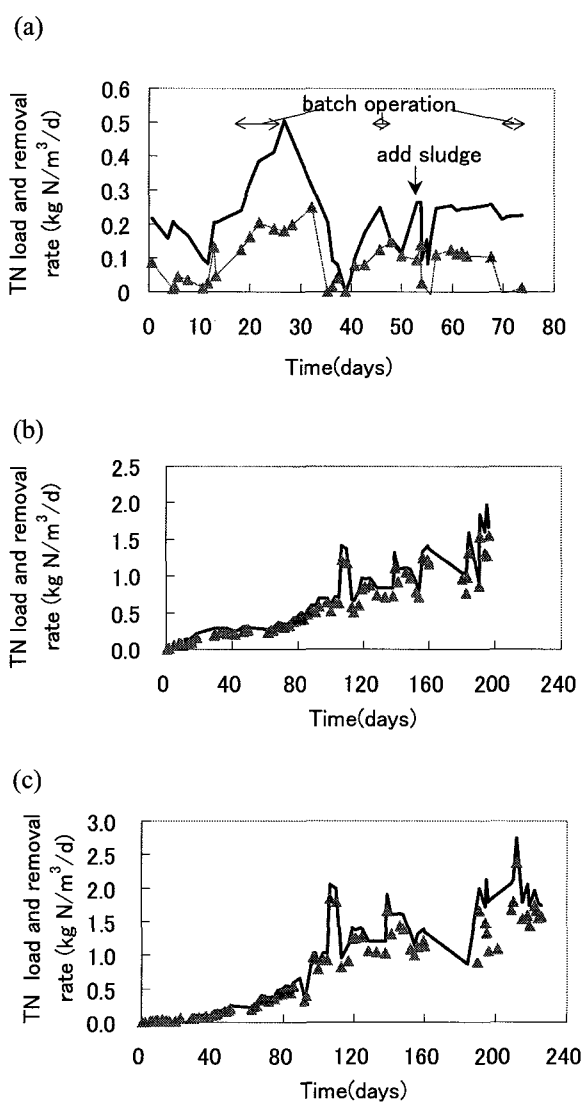


Fig. 3-2 Changes in nitrogen load and removal rates for three reactors; (a) sequencing-batch reactor, (b) fixed-bed reactor with nonwoven carriers, (c) fluidized-bed reactor with tube-shaped attachment carriers



Fig. 3-3 Red biofilm attached on polyester nonwoven

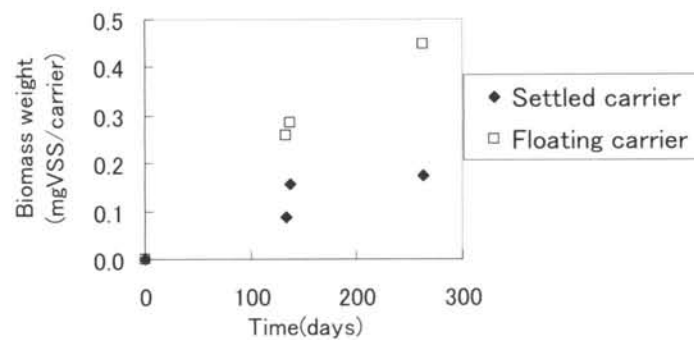


Fig. 3-4 Biomass weight attached on the settled tube-shaped carriers and the floated tube-shaped carriers

3-3-2 処理の安定性と酸素の暴露との関係

試験期間中の各リアクターの最大窒素除去速度は、シーケンシャルバッチリアクターが $0.25 \text{ kg N/m}^3/\text{d}$ 、不織布リアクターが $1.55 \text{ kg N/m}^3/\text{d}$ 、筒状担体リアクターが $2.38 \text{ kg N/m}^3/\text{d}$ であった。筒状担体リアクターの処理速度が不織布リアクターよりも大きかったのは担体表面積が大きいためと考えられるが、表面積の差と比較すると処理速度の差は小さかった。これは、不織布の内部まで汚泥が入りこみ汚泥保持量が予想より多かったことと同時に、筒状担体の表面が有効に使われていないことが考えられる。Fig. 3-4からも担体への汚泥付着量にばらつきがあることがわかり、添加した担体全てが有効に使われていないことが示唆された。また、筒状担体の内側にAnammox反応により発生したガスが貯まることにより、担体が浮上する現象が見られたことから、担体の流出防止のためのスクリーンの設置や、発生したガスを担体から放出させるため攪拌方法を検討するといった対策が必要となる。不織布リアクターでは汚泥の付着量が経時的に増加し一部目詰まりが生じたことから、実装置への適用の際には定期的な付着汚泥の剥離・洗浄が必要である。

実験から推測された各リアクターの汚泥保持能力は、シーケンシャルバッチリアクターが約 5 g/L 、不織布リアクターが約 10 g/L 、筒状担体リアクターが約 10 g/L であった。固定床あるいは流動床の生物膜型リアクターの方が浮遊型よりも高い窒素負荷をかけることが可能であり、リアクター内部に充填できる担体量を勘案すると、流動床が最も高い窒素負荷で運転できる可能性を有している。

処理の安定性については、浮遊増殖型のシーケンシャルバッチリアクターのAnammox活性が非常に不安定だったのに対し、固定床型の不織布リアクター、流動床型の筒状担体リアクターの窒素除去速

度は窒素負荷量の増加に伴って安定した上昇傾向を示し、運転期間約200日の間に極端なAnammox活性の低下は見られなかった。温度、pHといった運転条件は4つのリアクターに違いがないため、安定性の違いの原因は、不定期に行ったリアクターのメンテナンス時に、リアクターの上部を開放した際に汚泥がわずかながら空気に暴露されたことによると推察された。本実験においては、浮遊型リアクターではリアクターの開口部が数分間空気に暴露された後には大きく活性が低下した一方で、不織布、筒状担体をリアクターから取り出し、約1時間空気中に暴露させた後リアクターに戻した場合には活性低下がみられなかった。

不織布リアクターについては別の実験においても500日間継続したAnammox反応が確認されており、30°C付近における速度は1.51 kg N/m³/dであった⁵⁾。

Anammox微生物の酸素による阻害は可逆性であるが、酸素分圧0.5、1.0、2.0%の気体で飽和した培地においてはNH₄-N、NO₂-Nともに減少せず、完全な無酸素状態とすることが必要であるという報告がある²⁾。生物膜が酸素に暴露された場合の酸素の透過厚さは以下の式で表される。

$$\delta = \sqrt{\frac{2 \cdot D_{O_2} \cdot C_{O_2}}{q_{O_2} \cdot C_x}} \quad (3-1)$$

$$D_{O_2} = 2.5 \times 10^{-3} (\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1})$$

δ : 酸素浸透厚さ (mm)

D_{O_2} : 酸素の拡散係数 (mm²・s⁻¹)

C_{O_2} : 水溶液中酸素濃度 (g O₂・L⁻¹)

C_x : 生物膜密度 (g VSS・L⁻¹)

q_{O_2} : 酸素消費速度 (g O₂・g VSS⁻¹・s⁻¹)

生物膜がAnammox微生物のみから成るならば q_{O_2} の値は0であり、酸素は生物膜最奥部まで完全に浸透する。しかし、生物膜表面に酸素を消費する硝化菌あるいは従属栄養細菌が存在していれば、生物膜の内部は嫌気性に保たれ、酸素による阻害を防止できる。実際に、不織布に付着した生物膜中の微生物を解析した結果、Anammox微生物とともに*Zoogloea ramigera*類縁菌が存在したという事例が藤井らによって示されており、生物膜として存在することでAnammox微生物が安定化していることが示唆されている⁶⁾。

生物膜密度もまた浸透厚さに大きく影響する。フロック状汚泥と担体に付着した生物膜では、生物膜の密度には大きな差があると考えられ、フロック状汚泥では僅かな酸素の混入でも影響を受けるが、汚泥密度の高い生物膜の状態では多少の酸素の混入は活性低下を引き起こすことはないと思察される。

酸素の阻害を受け活性が低下すると、Anammox微生物の窒素除去速度が低下し、処理しきれないNH₄-NとNO₂-Nが系内に残存する。原水を処理水によって希釈するプロセスを組んでいる場合、希釈効果がなくなり、原水注入部は高濃度のNO₂-Nに暴露され、Anammox微生物はNO₂-Nの濃度阻害によりさらに活性が低下する。したがって、安定した処理を行うには酸素による阻害の防止は必須条件である。浮遊増殖型の場合には酸素の混入を厳密に防ぐ設備が必要となり、処理設備の簡易さという利点が失われることから、実際の処理への適用は難しいと考えられる。

第4節 結語

浮遊増殖型リアクターとして沈殿槽を有しないシーケンシャルバッチ方式の浮遊型リアクター、固

定床型リアクターとして不織布を充填した上向流リアクター、流動床型リアクターとしてプラスチック筒状担体を付着担体とする上向流リアクターを選択し、これら3種類のリアクターを用いてAnammox微生物に適したリアクター形状についての検討を行った。その結果、Anammox微生物の連続培養には、浮遊増殖型、固定床型、流動床型いずれのリアクターも用いることが可能であるが、酸素混入による活性低下を防ぎ、安定した処理を行うには生物膜型である固定床型、流動床型の方が良いことが示された。リアクター容積負荷は担体表面積が大きい流動床型が最も大きく、筒状担体リアクターでは最大2.38 kg N/m³/dを達成した。担体充填量、種類、サイズの検討により、より高い負荷が期待できると考えられる。

第3章参考文献

- 1) 今城麗, 安井英斉, 石田浩昭, 藤井隆夫, 杉野浩幸, 古川憲治 (2004) 活性汚泥からのANAMMOX微生物の集積培養, *水環境学会誌*, **27**(6), 413-418.
- 2) Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J.G. and Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(6), 2446-2448.
- 3) Strous M., Kuenen J.G. and Jetten M.S.M. (1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(7), 3248-3250.
- 4) 日本下水道協会編 (1997) 下水試験方法, pp.162-163, 東京.
- 5) Rouse, J.D., Yoshida, N., Hatanaka, H., Imajo, U. and Furukawa, K. (2003) Continuous treatment studies of anaerobic oxidation of ammonium using a nonwoven biomass carrier, *Jpn. J. Wat. Treat. Biol.*, **39**(1), 33-41.
- 6) Fujii, T., Sugino, H., Rouse, J.D. and Furukawa, K. (2002) Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a non-woven biomass carrier, *J. Biosci. Bioeng.*, **94**(5), 412-418.

第4章 Anammox 微生物のグラニューール化の検討

第1節 概説

第3章において、Anammox 微生物を生物膜として担体に付着させることが、酸素への暴露に対する阻害を抑制し、処理の安定性を保つのに有効であること、流動床型リアクターで最も高い窒素除去速度を達成できる可能性があることを示した。この結果と、Anammox 微生物が凝集しやすい性質を有するという第2章で得られた知見から、自己造粒（グラニューール）型リアクターの作成を試みることにした。

グラニューールとは、微生物が自己造粒し直径 1~3mm 程度の球状になったものを言う。微生物を担持させるための担体を必要としないため、経済的にメリットがある。また固液分離に沈殿槽を必要とせず、通常はリアクターの上部に設けられた気固液分離装置（GSS）によって分離されリアクター内に保持される。リアクター内に約 50gVSS/L という高濃度の微生物を保持することが可能であり、浮遊型、流動床型と比較して高い容積負荷を期待できる¹⁾。したがって、リアクターの容積は小さくでき、また設置面積も小さくて済むというメリットを有する。

応用実績にはメタン菌グラニューールが挙げられる。メタン菌グラニューールはメタン菌が自己造粒したものであり、嫌気条件下で有機物からメタンを発生させる。グラニューール化したメタン菌は容易に壊れず、冷蔵保存しても活性を失わないなど扱いが容易である。現在では、高濃度有機排水処理のために、メタン菌を利用した UASB(upflow anaerobic sludge blanket)リアクターが数多く運転されている^{2,3)}。

グラニューール化の課題は、処理を担う微生物が自己造粒能を有していなければならないことと、その微生物のグラニューール化に通常数ヶ月から数年という長い時間を要することである。この課題を解決するため、多くの研究者がグラニューール化促進のための研究を行っている。無機成分の添加については、Mahoney ら、Yu らはカルシウム、Schen らは重金属 (Ni, Co, Fe)、Schmit らはマグネシウム、Yu らは AlCl₃ によりグラニューール化が促進できるとしている^{4~8)}。また、Fang らはタンパク質加水分解物、El-Mamouni らはポリマーの添加を提案している^{9, 10)}。Yoda らは、径 0.3~0.6mm のろ過砂（マイクロキャリア）の利用、Inoue らは UF 膜システムの利用によるグラニューール化の促進方法を提案している^{11, 12)}。

グラニューール化の機構解明についての研究も行われている。Yan らはグラニューール化のプロセスを acclimation、granulation、maturation の 3 段階と特徴付けた¹³⁾。グラニューール化は、微生物の self-immobilization と、aggregate formation と growth によってできる。流体力学 (Hydrodynamics) による選択プレッシャーも不可欠である。生物学的な選択と物理的な選択によって沈降性の良いグラニューールが形成される。また、グラニューール形成には filamentous bacteria の存在や、細胞外ポリマーの存在も重要な役割を果たしている。グラニューール化のモデルには、Physico-chemical model、Structural model、Proton translocation-dehydration theory、Cellular automation model、Cell-to-cell communication model など様々なものが提唱されており、Liu らはそれらを踏まえてグラニューール化を 4 段階に整理している¹⁴⁾。

上記のようにグラニューール化についての研究は進んできたとは言え、新たな微生物を用いて短期間でグラニューール化を行うことは、やはり未だ難しいと考えられる。

メタン菌グラニューールの特徴の中で、増殖速度が遅く、収率の低い嫌気性微生物であるという部分は Anammox 微生物と共通している。Anammox 微生物がグラニューール化できれば、固液分離のための沈殿槽、微生物固定化のための担体は共に不要となる。またリアクター内に保持できる微生物量は浮

遊型、流動床型と比較して格段に多くなり、リアクター容積当たりの高い負荷量をかけることができる。したがってリアクター容積は小さくでき、設備費用・運転費用ともに小さくすることが可能である。また、Anammox 微生物のグラニューールがメタン菌グラニューールと同等の径および密度を有しているならば、運転実績のある UASB リアクターをそのまま利用することが可能であり、開発期間を大幅に短縮できる。メタン菌のグラニューール化には長期間を要した。この期間を短縮するために、メタン菌グラニューールそのものを Anammox グラニューールの核として利用し、メタン菌グラニューールの表面に Anammox 微生物を付着生育させることにより擬似 Anammox グラニューールを作成することを発案した。メタン菌の自己分解による消滅と、長期運転の間に新たな Anammox グラニューールが派生的に形成されることを期待して実験を行った。

本研究の目的は、グラニューールを用いた上向流リアクターを用いることにより、1)Anammox 微生物のグラニューール化の可否を調べること、2)グラニューールの物理的特徴を評価すること、3)グラニューールを用いた上向流リアクターの最大窒素除去速度実験的に決定することである。これらの目的を達成するため、まず Anammox 微生物のグラニューール化を 6.4L のラボスケールリアクターで合成基質を用いて検討した。次に、200L のパイロットリアクターを用いて、下水処理場においてグラニューール化した Anammox 微生物による嫌気消化脱離液を処理対象基質とした実験を行った。

第 2 節 実験方法

4-2-1 ラボ実験

ラボ実験に用いたリアクターの構造を Fig.4-1 に示す。径 100mm、高さ 760mm、容積 6.4L の上向流リアクターであり、上部に固液分離部を備えている。このリアクターの上流には Anammox 微生物の培養を約 6 ヶ月間行っている不織布を担体とする 1.5L のリアクターが設置されており、Anammox 微生物を保持している^{15, 16, 17)}。この不織布リアクターの流出水中に含まれる Anammox 微生物が後段の上向流リアクターに供給されることになる。メタン菌のグラニューールを Anammox 微生物の担体として利用するために、上向流リアクターにはビール工場の排水を処理するフルスケールの EGSB から採取したメタン菌グラニューールを 2L 充填した。実験を開始する前に、メタン菌グラニューールは 0~300 mgN/L の NaNO_2 と 0~1000 mgN/L の NaNO_3 含む培地で酸素条件下で培養した。この培養は、 NO_x の消費がほぼなくなるまで行った。その後、Anammox 微生物を含む不織布リアクターの処理水を、Anammox 微生物の植種源として上向流リアクターに 111 日目まで継続して供給した。

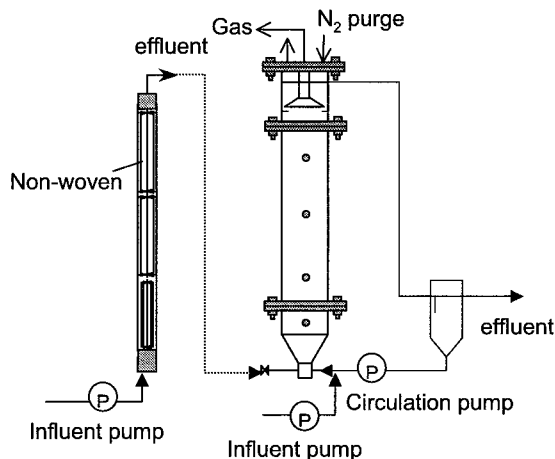


Fig. 4-1 Schematic diagram of lab-scale up-flow reactor system

合成排水は窒素ガスによる脱酸素を行った後にリアクターに通水した。pHは炭酸ガスにより7.5に、温度は30℃に調整した。合成排水の組成を **Table 4-1** に示す。高濃度 NO₂-N による阻害を防ぐため、上向流リアクターの処理水を循環させ、流入水の希釈に用いた。

Table 4-1 Composition of the synthetic medium

| | |
|--|-----------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.306-2.404 g/L |
| NaNO ₂ | 0.335-3.450 g/L |
| KHCO ₃ | 0.500 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 0.0272 g/L |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.180 g/L |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.120 g/L |
| Trace element solution I* (g/L): EDTA 5, FeSO ₄ ·7H ₂ O 9.14 | 1 mL/L |
| Trace element solution II* (g/L): EDTA 5, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.43, CoCl ₂ ·6H ₂ O 0.24, MnCl ₂ ·4H ₂ O 0.99, CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.25, NaMoO ₄ ·2H ₂ O 0.22, NiCl ₂ ·6H ₂ O 0.19, NaSeO ₄ ·10H ₂ O 0.21, H ₃ BO ₃ 0.014 | 1 mL/L |

4-2-2 パイロット実験

Fig.4-2 にパイロットスケールの実験に用いたリアクターを示す。径 250mm、高さ 4m の 200L 上向流リアクターが、300L (幅 90cm、奥行き 40cm、水深 90cm) の曝気槽の後に設置された。曝気槽の流入水は下水処理場の嫌気消化脱離液である。嫌気消化脱離液は 500~600mgN/L のアンモニウムを含有していた。亜硝酸の酸化を防ぐため、より高濃度のアンモニアを残存させる目的で、曝気槽の pH を 25%アンモニア溶液で 7.5 に調整した。この運転条件により、曝気槽の流出水にはアンモニアと亜硝酸がほぼ 1 対 1 の割合で含まれる状態となった。これに加え、パイロットスケールリアクターには NaNO₂ 溶液と、181 日目以降には Trace element solution I、II を添加した。アンモニアと亜硝酸を含んだ曝気槽の流出水は、3 連 (全体積 10L) の窒素ガスバブリング槽を通すことにより DO 濃度が 0.1mg/L 以下となるよう脱酸素した。

ラボスケール実験により得られた Anammox グラニュール 3L と、ビール工場排水工程からの、前述の処理をしたメタン菌グラニュール 92L をリアクターに投入した。リアクターの処理水に含まれる亜硝酸濃度を継続的にモニターし(IOL-50, DKK-TOA)、流入水の流入を間欠にすることにより 10mgN/L 以下に制御した。流入水注入口付近の亜硝酸濃度を阻害の起こる 100mgN/L 以下にするため、リアクターの処理水を循環して流入水を希釈した¹⁸⁾。リアクターの pH は CO₂ ガスにより 7.5 に調整し、温度は循環ラインにおいて 30℃に設定した。リアクターの上向流速は 2.3~4.7m/h で変化させた。

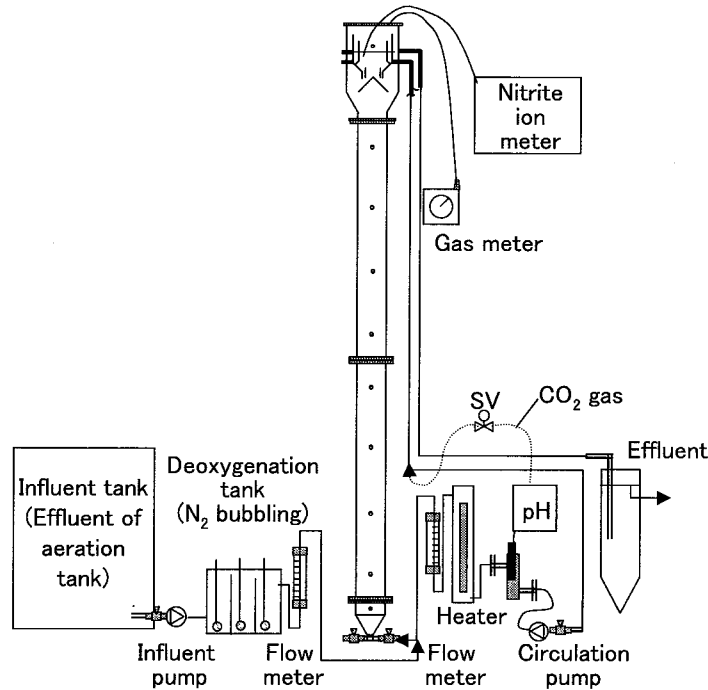


Fig. 4-2 Schematic diagram of the pilot-scale up-flow reactor system

4-2-3 分析方法

アンモニアは下水試験方法により比色法で分析した¹⁹⁾。亜硝酸と硝酸はイオンクロマトグラフ (ICS-A23, Yokogawa)により分析した。IC および TOC は TOC 計(TOC-5000, Shimadzu)により分析した。SS、VSS 分析は下水試験方法によった¹⁷⁾。グラニューールの粒径分布はイメージアナライザー (Video monitor equipped with MacSCOPE software)を用いて測定した。グラニューールの自由沈降速度は水を入れた透明な PVC シリンダー(70 mm diameter, 300 mm height)を用いて測定した。沈降速度はグラニューール径を 5 段階(<0.5 mm, 0.5 - 1.0 mm, 1.0 - 1.4 mm, 1.4 - 2.0 mm, >2.0 mm)に分け、それを基準にまとめた。グラニューールの観察には立体顕微鏡を用いた。

グラニューール汚泥の窒素除去速度は、圧力センサーを有する密閉フラスコを用いて、Table 4-1 に示す合成基質で 30°Cにおいて測定した。pH は 7.5~8.0 に調節した。培養期間中の圧力増加をコンピュータにより記録し、これにより理論的に同等な窒素ガス生成速度を算出した。

200L リアクターの窒素除去速度は、NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N 濃度の変化と流量により算出した。さらにその値を生成窒素ガス量から算出される窒素除去速度と比較することにより確認した。

第3節 実験結果および考察

4-3-1 ラボ実験

ラボスケールリアクターの窒素除去速度の変化を Fig.4-3 に示す。2~10mgSS/L の Anammox 微生物を含む不織布カラムの流出水を 111 日間ラボスケールの流入水として使った。窒素除去速度は実験期間を通して上昇し、バイオマスの植種が終わってからも上昇傾向は続いた。173 日後には窒素除去速度は 2.87 kg N/m³/d となった。この結果より、Anammox 微生物が上向流リアクターに固定化され、増殖したことが明らかとなった。

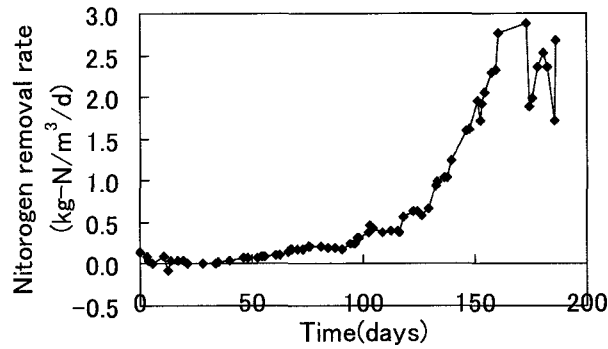


Fig. 4-3 Time course of nitrogen removal rates in the lab-scale experiment

グラニュールの形状を立体顕微鏡を使って観察した。実験開始時にはメタン菌グラニュールは黒色だったが、徐々に茶色に変化した。さらに、メタン菌グラニュールの表面に赤い生物膜が付着しているのが観察され、その量は徐々に増加した。実験期間中のグラニュールの径は 0.9~1.2mm であった。メタン菌グラニュールは消失せず、Anammox グラニュールの中心部分に残存した。Anammox 微生物はすべてメタン菌グラニュールの表面に存在しており、180 日の実験期間中に Anammox 微生物のみから成るグラニュールは観察されなかった。

4-3-2 パイロット実験

Fig.4-4に実験期間中の窒素除去速度の変化を示す。約100日後に窒素除去速度は約2 kg N/m³/dまで上昇した。しかし、次の約2ヶ月間、原因不明の活性低下が起こった。いくつかの検討の結果、嫌気消化脱離液中には微量元素が不足しているためではないかと判明し、181日目からは微量元素の不足を補うためTrace element solutions I と II を添加した。この変更の後、窒素除去速度の継続的な上昇が観察された。最大窒素除去速度は6.39 kg N/m³/d (389日後) であった。

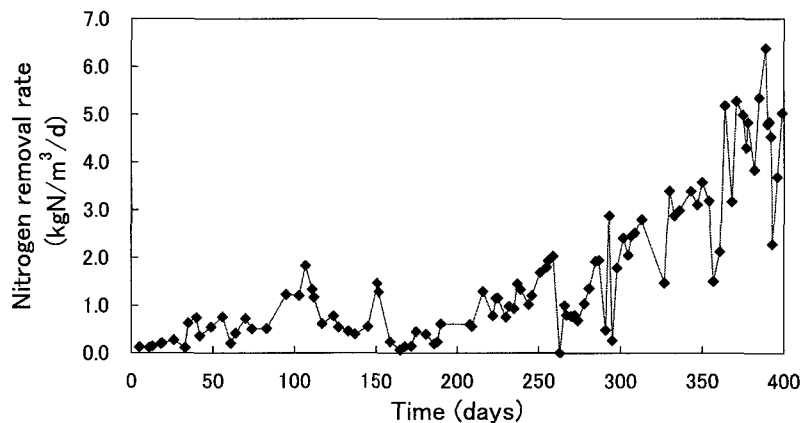


Fig. 4-4 Time course of the nitrogen removal rates in the pilot-scale experiment

389日~400日のリアクターの処理状況をTable 4-2にまとめた。1モルのNH₃-Nの除去に対し、0.26モルのNO₃-Nが生成し、1.32モルのNO₂-Nが消費された。Anammoxリアクターの理論上の最大窒素除去率は89%であるが¹⁶⁾、本実験においては最大92.3%の除去率がみられた。これは、嫌気消化脱離液に残存する生物分解可能な有機物を用いたメタン菌グラニュールの脱窒反応によると推察される。

Table 4-2 Reactor performance between day 389 and 400

| Influent (mg-N/L) | | | Effluent (mg-N/L) | | | Nitrogen removal rate (kg-N/(m ³ ·day)) | Nitrogen removal efficiency (%) |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|---------------------------------|
| NH ₄ -N | NO ₂ -N | NO ₃ -N | NH ₄ -N | NO ₂ -N | NO ₃ -N | | |
| 709 ~ | 927.8 ~ | 0 ~ | 0 ~ | 1.7 ~ | 114.6 ~ | 2.28 ~ | 86.5 ~ |
| 1027 | 1409.0 | 12.7 | 163.0 | 11.0 | 164.1 | 6.39 | 92.3 |

これらの結果から、Anammox グラニュールを用いた上向流リアクターで実際の消化脱離液を処理できることが示され、嫌気消化脱離液の窒素除去法として本法を適用することが可能であることが明らかになった。さらに、少量の Anammox バイオマスを種汚泥として利用することによって、3~5 ヶ月という短い期間で Anammox グラニュールリアクターを立ち上げることが可能であった。ただし、脱離液中に含まれる微量元素のバランスをチェックし、Anammox プロセスに適するような成分調整は必要であると考えられる。

4-3-3 グラニュールの変化

メタン菌グラニュールは黒色から徐々に茶色がかった色に変化した。それに加え、赤いバイオフィームがグラニュール表面に形成された。赤い色のグラニュールの数は時間の経過とともに増加した。Fig.4-5 に示すように、6 ヶ月の運転後にも大きなサイズの Anammox グラニュールの中央には種汚泥として用いたグラニュールが観察されたが、小さいサイズのグラニュールにはメタン菌グラニュールが観察されなかった。通常、種グラニュールを用いた場合のグラニュール生成は、1)バイオフィームが種グラニュール上に付着し成長する、2)バイオフィームの成長が進行する、3)過度に成長したバイオフィームが剥離する、4)剥離したバイオフィームから新しいグラニュールが形成される、という段階を経ると考えられる (Fig.4-6)。グラニュール化の促進には、大きな接触面積を適切に供給するという第一段階が非常に重要であることは明らかである。本実験の結果により、メタン菌グラニュールは Anammox グラニュールの形成に対し効果的で経済的な接触担体の材料となり得、それにより迅速なリアクターの立上げが可能となったことが示された。

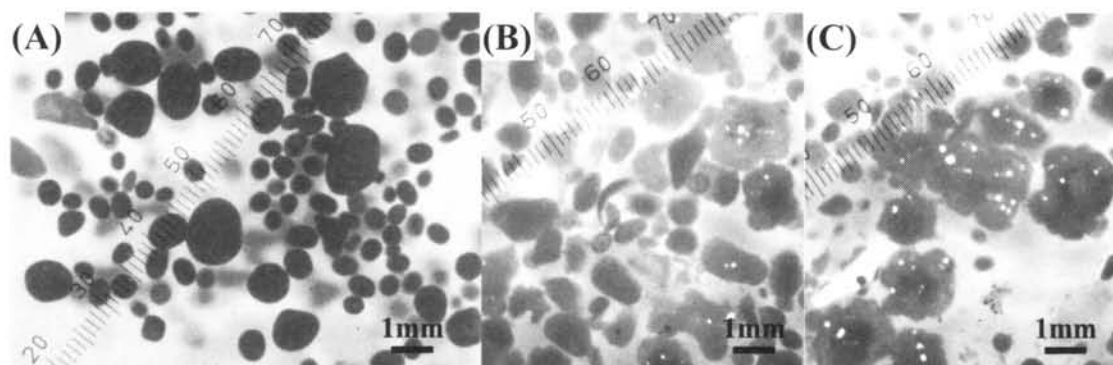


Fig. 4-5 Micrographs of granules in the pilot-scale experiment: (A) Initial phase, (B)(C) After 6 months of operation

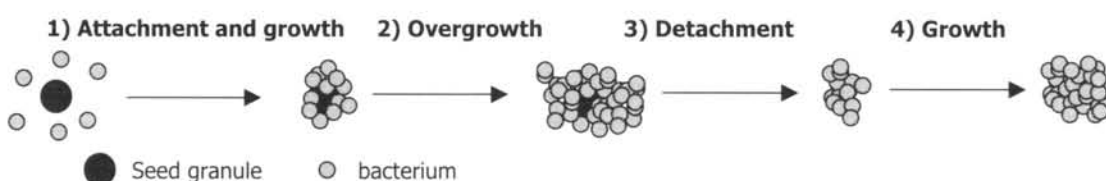


Fig. 4-6 Conceptual diagram of granulation model

グラニューールベッドの VSS 濃度にベッド体積を乗じた全 VSS 量は、1 年の実験期間後に 4114g から 5717g に増加した。膨張したグラニューールベッドの VSS 濃度のプロファイルを示す。グラニューールベッド高さは経時的に上昇したが、VSS 濃度は徐々に減少した。1 年の実験期間後、リアクター内の VSS 濃度は 20~31g/L の範囲となった。

グラニューール平均径のプロファイルを示す。平均径は低部近くでわずかに増加したが、一方中部と上部では実験期間中ほぼ 1.0mm を維持し、変化は見られなかった。

グラニューールの汚泥当たりアンモニア除去速度のプロファイルを示す。リアクターの窒素除去速度がまだ低い 153 日目において、グラニューールベッドの上部のみが顕著に高い活性を有していた。窒素除去速度は上部から順に徐々に上昇し、371 日目にはベッド全体で均一な値を持つようになった。これらの Anammox 活性と VSS 濃度から算出したリアクター全体の窒素除去速度は、Fig.4-4 に示す値とほぼ一致した。

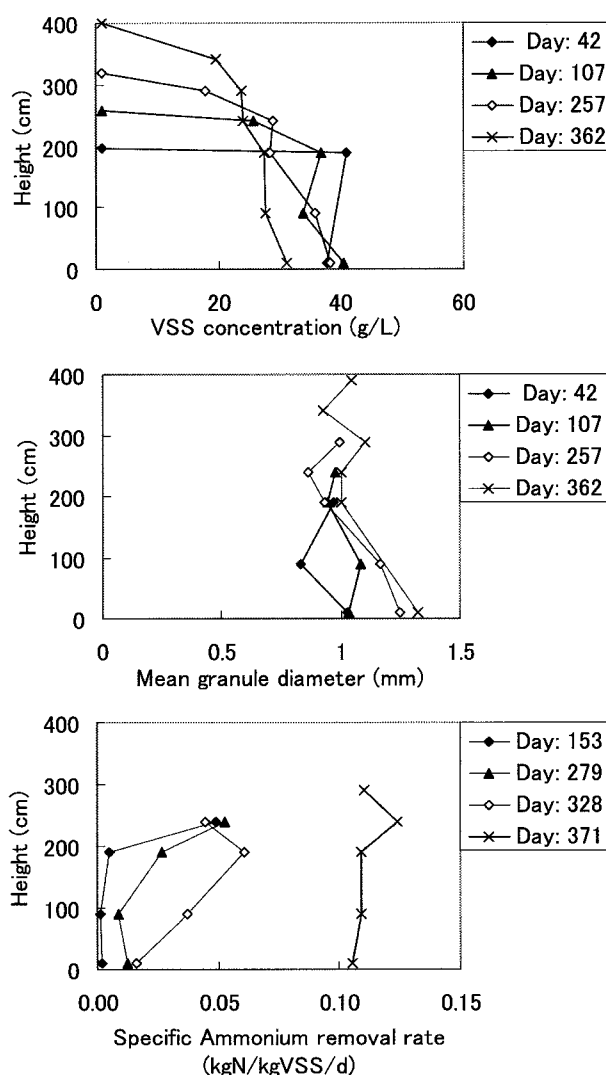


Fig. 4-7 Profiles of sludge concentration, granule size and specific nitrogen removal rate: (a) VSS concentration; (b) Mean diameter; (c) Specific ammonium removal rate

全 VSS 量が増加し、グラニューールサイズがほとんど変化しなかったことから、グラニューールの数が増加していることが示唆された。VSS 濃度の減少は、発生ガスと液体の流速が上がることによって間

隙が増加したことと合わせ、グラニューールの密度が低下したことを示唆している。グラニューールの Anammox 活性の上昇は Anammox 微生物がグラニューールの形でリアクター内に集積したことを表している。

4-3-4 グラニューールの特性

グラニューールの自由沈降速度を、5 段階の異なったサイズについて測定した。Fig.4-8 にメタン菌グラニューールと Anammox グラニューールの自由沈降速度を示す。図中に示すメタン菌グラニューールのデータは、実験初期におけるベッド低部のグラニューールの自由沈降速度であり、Anammox グラニューールのデータは、1 年後におけるベッド上部のグラニューールのものである。

沈降速度を用いて、グラニューールを球形と仮定してグラニューールの密度を Stokes の式により算出した。密度は 1043 (径: 1.4-2.0 mm)、1124 (<0.5 mm) (kg/m^3) から 1016 (1.4-2.0 mm)、1100 (<0.5 mm) (kg/m^3) に低下した。Anammox グラニューールは種に用いたメタン菌グラニューールと比較して約 2~3 %低い密度を示した。

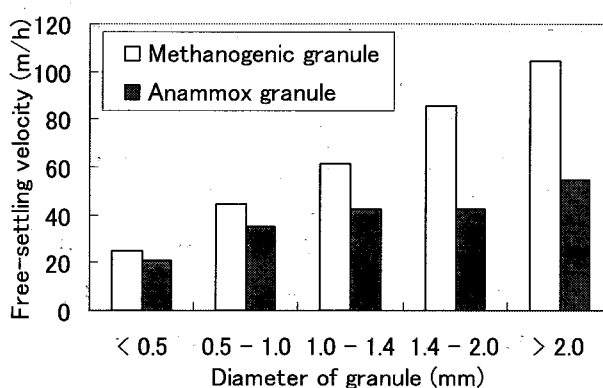


Fig. 4-8 Comparison of free-settling velocities for methanogenic granules and Anammox granules

上向流リアクターの 3 つの位置 (Top、Middle、Bottom) のグラニューールについて、実験期間中の粒径分布の変化を Fig.4-9 に示した。実験期間を通じて、グラニューールは 0.2mm から 3mm の分布を持ち、平均径は約 1.0mm であった。詳細に見ると、初期のグラニューールの粒径分布と比較すると、時間の経過にしたがって分布は広がりを持つように観察された。これは大小のグラニューールの増加によるものであり、バイオフィルムの成長と、バイオフィルムから剥離した新しいグラニューールの生成を示唆していると考えられる。

水道水中で 1 時間曝気したときのグラニューール形状の変化を基準に、グラニューール強度についても評価したが、Anammox グラニューールとメタン菌グラニューールに大きな違いはみられなかった (data not shown)。

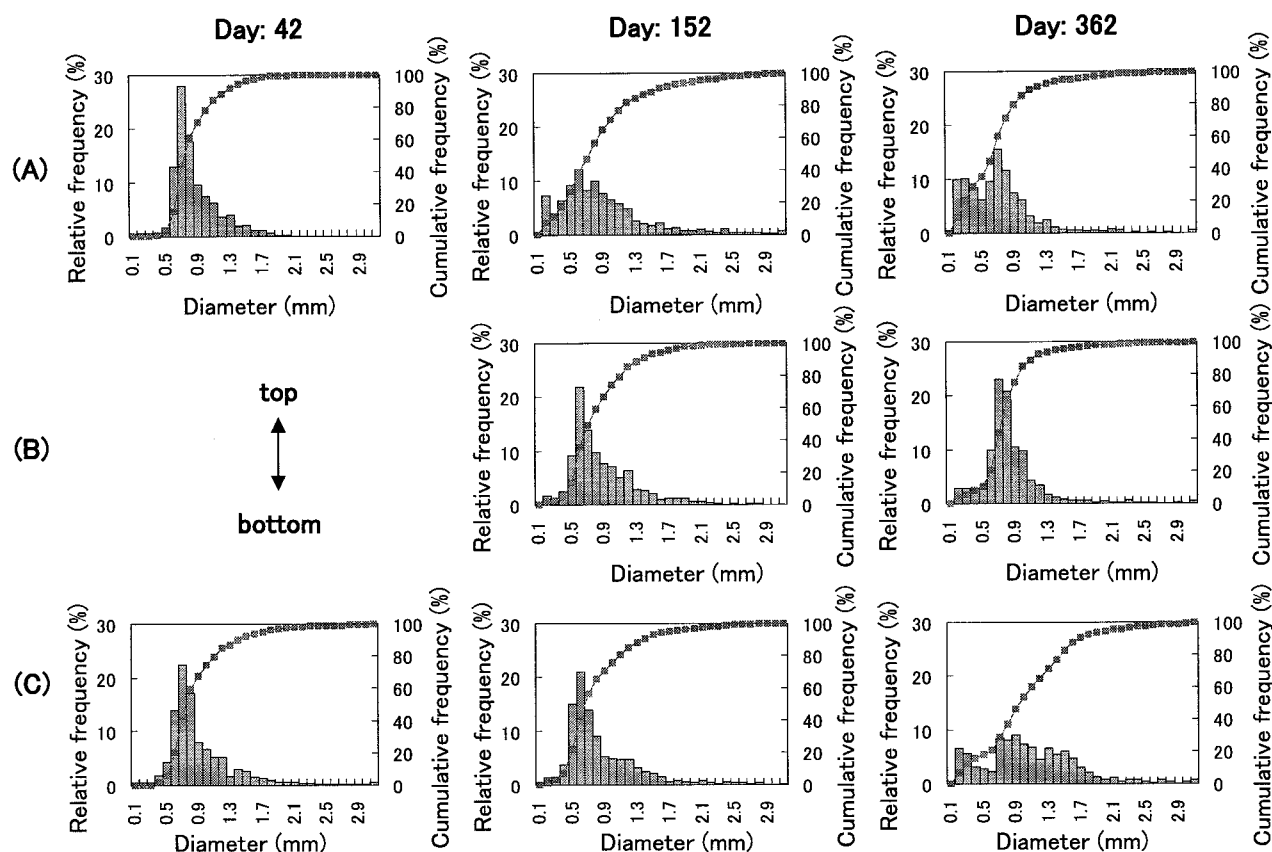


Fig. 4-9 Distribution curve of granule diameter: (A) Top of bed: 80-100 % of granule-bed height, (B) Middle of bed: 40-60 % of granule-bed height, (C) Bottom of bed: 0-20 % of granule-bed height

Anammox グラニューールの特性を **Table 4-3** にまとめた。Anammox グラニューールはメタン菌グラニューールよりも僅かに低い密度を有していた。このために Anammox グラニューールベッドの VSS 濃度が低かったと考えられる。平均径と粒径分布はメタン菌グラニューールと同等であった。これらの結果から、Anammox 上向流リアクターの開発に、UASB リアクターに関するノウハウを利用できることが明らかとなった。

Table 4-3 Comparison of Anammox and methanogenic granules

| Property | Anammox granules | Ratio to methanogenic granules |
|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Mean diameter | 0.9 ~ 1.3 mm | 99 ~ 129 % |
| Free-settling velocity | 21 ~ 54 m/h | 49 ~ 83 % |
| Density | 1016 ~ 1100 kg/m ³ | 97 ~ 98 % |
| VSS concentration in granule bed | 20 ~ 31 mgVSS/L | 51 ~ 79 % |
| Specific ammonium removal rate | 0.11 ~ 0.12 kgN/kgVSS/d | - |
| Size distribution | Broad distribution from 0.2 to 3.0 mm | - |
| Strength | No significant difference | - |

第 4 節 結語

第 3 章で得られた知見をもとに、安定した処理が行える流動床リアクターの考え方を発展させ、高負荷処理に対応できる Anammox グラニューールリアクターの構築を目指した。UASB 法のメタン菌グラニューールを付着担体として Anammox 微生物を増殖させ、メタン菌グラニューールを核とした Anammox

グラニューールの形成を試みた。Anammox 微生物のグラニューール化について、合成基質を用いたラボスケールリアクターと嫌気消化脱離液を用いたパイロットスケールリアクターで検討を行った結果、Anammox 微生物は両方のリアクターにおいてメタン菌グラニューールの表面に付着し増殖した。さらに、新しい Anammox グラニューールの生成も確認された。

グラニューールの大きさや物理的特徴は UASB 法のメタン菌グラニューールと同程度であったことから、実在している数多くの UASB リアクターに関するノウハウを Anammox グラニューールリアクターの開発に利用できると考えられる。自己造粒させるのではなく、メタン菌グラニューールを担体として用いるこの方法は、立上げ期間を大幅に短縮することが可能である。この方法によって、1 年以内に $6 \text{ kgN/m}^3/\text{d}$ 以上の高い窒素除去速度を達成することができた。高い窒素除去速度により、リアクターの小型化が可能となり、また塔型のグラニューールリアクターとすることで設置面積の縮小も可能となる。パイロットリアクターの処理結果から、Anammox グラニューールリアクターを嫌気消化脱離液からの窒素除去プロセスとして利用可能であることが明らかとなった。

第4章参考文献

- 1) Fang, H.H.P. and Chui, H.K. (1993) Maximum COD loading capacity in UASB reactors at 37C, *J. Envir.Engrg.*, ASCE., **119**(1), 103-119
- 2) Lettinga G. and Hulshoff Pol L.W. (1991). UASB process design for various types of wastewater. *Wat. Sci. Technol.*, **24**(8), 87-107.
- 3) Lettinga G., van Velsen A.F.M., Hobma S.W., de Zeeuw W. and Klapwijk A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotech. Bioeng.*, **22**, 699-734.
- 4) Mahoney, E.M., Varangu, L.K., Cairns, W.L., Kosaric, N., Murray, R. (1987) *Water Sci. Technol.* **19**, 249-260.
- 5) Yu, H.Q., Tay, J.H. and Fang, H.H.P. (2001) The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up, *Wat. Res.*, **35**(4), 1052-1060.
- 6) Shen, C.F., Kosaric, N., Blaszczyk, R. (1993) The effect of selected heavy metals (Ni, Co and Fe) on anaerobic granules and their extracellular polymeric substance (EPS), *Wat. Res.*, **27**, 25-33.
- 7) Schmit, J.E., Ahring, B.K. (1993) Effects of magnesium on thermophilic acetate-degrading granules in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors, *Enzyme and Microbial Technology*, **15**, 304-310.
- 8) Yu, H.Q., Fang, H.H.P. and Tay, J.H. (2001) Enhanced sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by aluminum chloride, *Chemosphere*, **44**, 31-36.
- 9) Fang, H.H.P. (1994) Performance and granule characteristics of UASB process treating wastewater with hydrolyzed proteins, *Wat. Sci. Tech.*, **30**(8), 55-63.
- 10) El-Mamouni, R., Leduc, R. and Guiot, S.R. (1998) Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process, *Wat. Sci. Tech.* **38**(8-9), 341-347.
- 11) Yoda, M., Kitagawa, M. and Miyaji, Y. (1989) Granular sludge formation in the anaerobic expanded micro-carrier process. *Wat. Sci. Tech.*, **21**, 109-122.
- 12) Inoue Y., Takahashi J. and Tanaka M., Acceleration of microbial granulation for a start-up phase in a UASB reactor with a UF membrane system, (1997) *Proc. 8th International Conf. On Anaerobic Digestion*, Vol.2. 79-85.
- 13) Yan, Y. and Tay, J.H. (1997) Characterisation of the granulation process during UASB start-up, *Wat. Res.*, **31**(7), 1573-1580.
- 14) Liu, Y., Xu, H.L., Yang, S. and Tay, J.H. (2003) Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Wat. Res.*, **37**, 661-673.
- 15) Furukawa K., Rouse J.D., Bhatti Z.I. and Imajo U. (2000). Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) in continuous flow treatment with non-woven biomass carrier. *Proceedings of the ICEB 2000, Fifth Intl. Symposium on Environmental Biotechnology*, International Society for Environmental Biotechnology (CD-Rom)
- 16) 今城麗, 安井英斉, 石田浩昭, 藤井隆夫, 杉野浩幸, 古川憲治 (2004) .活性汚泥からの ANAMMOX 微生物の集積培養, *水環境学会誌*, **27**(6), 413-418.
- 17) Imajo U., Ishida H., Fujii T., Sugino H., Rouse J.D. and Furukawa K. (2001). Detection of Anammox activity from activated sludges. *Proceedings of IWA Asia-Pacific Regional Conference (Asian waterqual 2001)*, I, 887-892.
- 18) Strous M., Kuenen J.G. and Jetten M.S.M. (1999). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(7), 3248-3250.
- 19) 日本下水道協会編 (1997) 下水試験方法, 東京

第5章 Anammox グラニュールリアクターの運転条件

第1節 概説

本章では、第4章で実用化の可能性が示された Anammox グラニュールリアクターの運転条件(温度、pH、NO₂-N 濃度)の検討を行う。Anammox 微生物がグラニュールの形態で存在する状態での至適範囲を把握するとともに、至適範囲を外れた場合の反応速度の変化、復帰に要する時間についての知見を得ることを目的とした。

まず、グラニュール状態での温度影響を調べるため、第4章のパイロット実験に用いた上向流リアクターから採取したグラニュールを用いて 23~35℃における NH₄-N 濃度変化を回分実験で測定した。次に、反応を0次と近似してよい NH₄-N・NO₂-N の濃度範囲を求めるため、①NH₄-N 存在下での NO₂-N 濃度変化、②NO₂-N 存在下での NH₄-N 濃度変化を測定した。これは Anammox 反応をモデル化し、シミュレーションを行ってリアクターの能力を概算する際に必要である。さらに、運転条件の一因子である pH の影響を評価した。Anammox 処理に供される被処理水にバッファー能がない場合、Anammox 反応により pH が変化することから、不完全混合リアクターでは、内部に pH のプロファイルが生じる。Anammox 微生物の至適 pH は、回分実験により 6.7~8.5 (最適 pH は 8.0) との既報の報告がある¹⁾が、連続系における pH の影響、あるいはリアクター内部にプロファイルを有する場合の pH の影響を調べた例はない。連続系において pH がリアクターの処理能力に与える影響を確認することは、運転条件の決定に寄与することはもちろん、pH が設定値から大幅に変動した場合における能力低下の度合いを把握することで緊急時の対応方法を確立することにも寄与する。

次に、NO₂-N 濃度の影響について調べた。完全混合リアクターでない場合においては、流入部分の Anammox 微生物は被処理水の NO₂-N 濃度に暴露されることになる。したがって、高濃度 NO₂-N を処理する場合、阻害を防ぐためには低濃度の水、例えば処理水で希釈する必要がある。許容できる濃度範囲が広ければ、希釈のための循環水量を減らすことができ、運転コストの低減を図ることができるため、許容できる濃度範囲を知っておくことはリアクターの設計において重要である。Anammox 微生物は NH₄-N と NO₂-N を基質として直接窒素ガスへ変換する反応経路を有するが、基質となる NO₂-N は高濃度 (75mgN/L 以上) になると濃度阻害を有すると報告されている²⁾。過去の実験において、トラブルによって高濃度 NO₂-N (240mgN/L 以上) に暴露された事例について、暴露時間と活性への影響を Table 5-1 に示す。

Table 5-1 Example of exposure to high nitrite concentration

| Cultivation style | Nitrite conc. | Exposure time | Effect to activity |
|-------------------|---------------|---------------------------------------|---|
| Batch | 240mgN/L | <1hour | No effect |
| Continuous | 240mgN/L | 1day | No effect |
| Continuous | 338mgN/L | 2days (>300mgN/L) | Decline to 61%. 100% recovery after 2.5days |
| Continuous | 420mgN/L | 3days | 58% recovery after 12days |
| Continuous | 640mgN/L | 6days (>300mgN/L) | Decline to 20%. 100% recovery after 49days |
| Continuous | 702mgN/L | Approximately 3days (>600mgN/L) | Decline to 34%. 100% recovery after 20days |

連続的に高濃度の NO₂-N に暴露された場合の活性への影響について定量的な評価を行うため、グラニューールを用いた回分実験およびゲル付着生物膜を用いた連続実験を行った。さらに、グラニューールリアクターでの影響を確認するため、Anammox グラニューールを充填したラボスケールの上向流リアクターを用いて、リアクター内に基質濃度のプロファイルが存在する条件において、最も高濃度となる基質注入部の NO₂-N 濃度がリアクターの窒素除去速度に及ぼす影響と、リアクターの窒素除去反応が維持される注入部の上限 NO₂-N 濃度を調べた。

第2節 実験方法

5-2-1 温度の影響

第4章のパイロット実験に用いた上向流リアクターのベッド上部から採取したグラニューールをサンプルとして、23、27、30、33、35°Cにおける NH₄-N 濃度変化を回分実験で測定した。反応容器には 100ml 三角フラスコを用い、恒温水槽を用いて温度を制御した。窒素曝気により脱酸素した Table5-2 に示す無機合成培地にグラニューールを添加し、NH₄-N・NO₂-N を各 80mgN/L となるよう添加した後、pH を 7.5~7.8 に調整し、40~60 分おきに窒素ガスと置換する形でサンプリングした。サンプルがグラニューールであり、均一な汚泥濃度のサンプルを採取することが不可能であるため、上澄み液をサンプルとした。各サンプルの NH₄-N・NO₂-N・NO₃-N 濃度と、実験終了後に回収した全 SS、VSS 量を測定した。正確な NH₄-N 除去速度を算出するため、速度の計算には NH₄-N 濃度ではなく、NH₄-N 濃度に培地量を乗じた培地中の NH₄-N 量を用いた。

Table 5-2 Composition of synthetic medium

| | | | |
|---|---|--|----------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | Variable Variable 500mg (60mgC/L) 27.2mg 180mg 120mg 1ml 1ml 1L | Trace element I | |
| NaNO ₂ | | EDTA | 5 g/L |
| KHCO ₃ | | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 9.14 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | | Trace element II | |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | | EDTA | 5 g/L |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.43 g/L |
| Trace element I | | CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.24 g/L |
| Trace element II | | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.99 g/L |
| water | | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.25 g/L |
| | | NaMoO ₄ · 2H ₂ O | 0.22 g/L |
| | NiCl ₂ · 6H ₂ O | 0.19 g/L | |
| | NaSeO ₄ · 10H ₂ O | 0.21 g/L | |
| | H ₃ BO ₄ | 0.014 g/L | |

5-2-2 0次反応の濃度範囲

Anammox 反応を 0 次と近似可能な NH₄-N・NO₂-N の濃度の下限値を求めるため、①十分な NH₄-N が存在する状態における NO₂-N の低濃度域の減少速度、②十分な NO₂-N が存在する状態における NH₄-N の低濃度域の減少速度を測定した。5-2-1 の実験と同様の合成培地および反応容器を用い、温度は 30°C に設定した。開始時 NH₄-N 濃度と NO₂-N 濃度を①においては 40mgN/L と 10mgN/L、②においては 10mgN/L と 50mgN/L に設定して、30 分おきにサンプリングを行い NH₄-N、NO₂-N の濃度変化を調べた。上記同様に速度の計算には NH₄-N 濃度ではなく、NH₄-N 濃度に培地量を乗じた培地中の NH₄-N 量を用いた。

5-2-3 pHの影響

リアクターの全体図を **Fig.5-1** に示す。リアクターは径 50mm、容量 3.5L の筒状であり、上部に気固液分離装置を有する。リアクター内に体積 1L の Anammox グラニュール（第 4 章で作成したもの）を充填し、基質を底部から注入し、上向流で通水させ、上部から排出する一過式の運転を行った。流量は 2.7L/h、リアクターの HRT は 1.3h、LV は 1.4m/h とした。同じリアクターを 3 系列運転した。流入基質中の溶存酸素を、硝化菌をスポンジおよび吸水アクリル嵩高糸の担体に付着固定化した硝化カラムに通水することにより除去し、その後 pH 調整カラムで 0.2N 塩酸あるいは水酸化ナトリウム溶液により pH を設定値に調整した。pH は 5.7~9.0 まで変化させ、処理水水質からリアクターの処理能力を評価した。希釈水タンクは投げ込みヒーター、硝化カラムはウォーターバス、リアクターはウォータージャケットにより温度調節を行い、リアクター内の温度を 29~31℃ に維持した。基質に用いた無機合成培地の組成を **Table 5-3** に示す。

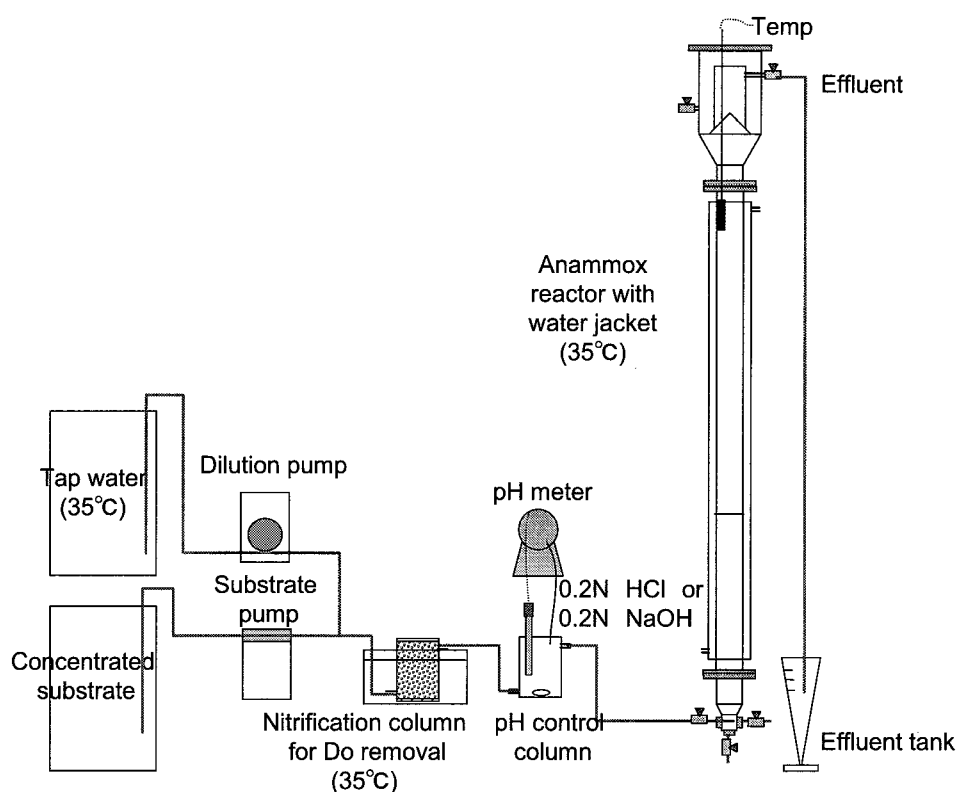


Fig.5-1 Schematic diagram of experimental device

Table 5-3 Composition of synthetic medium

| | | | |
|---|--------|---------------------------------------|----------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 471mg | Trace element I | |
| NaNO ₂ | 641mg | EDTA | 5 g/L |
| KHCO ₃ | 250mg | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 9.14 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 27.2mg | | |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 90mg | | |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 60mg | | |
| Trace element I | 1ml | | |
| water | 1L | | |

各態窒素濃度 (NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N) は、HACH 社の N チューブTM テスト法を用いて分析し、分光光度計 DR/2010 により測定を行った。各々の分析法はサリチル酸法、ジアゾ化クロモトローブ酸法、クロモトローブ酸法による。IC、TOC は、TOC 計 TOC-5000 (SHIMADZU) を用いて分析した。SS は下水試験方法によった。

5-2-4 グラニュールリアクターにおける NO₂-N 濃度条件の影響

第 4 章で作成した Anammox グラニュールを充填した Fig.5-1 の一過式上向流リアクターを用い、6 つの流入 NO₂-N 濃度条件について実験を行った。全ての系列の実験条件を Table 5-4 に示す。

Table 5-4 Experimental conditions

| Run | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ |
|-------------------------------------|-----------------------------|--|--|---|--|--|
| Influent NO ₂ -N (mgN/L) | 120 | 240 | 360 | 100→ 400~450 | 100→ 400~450 | 100→ 300 |
| Effluent NO ₂ -N (mgN/L) | | | | 100-150 | >200 | >200 |
| Flow rate (L/h) | 2.5(1-13day) 3.4(14day-) | 2.7 | 2.8 | 1.7(1-3day) 0.6(4day-) | 1.7(1-3day) 1.2(4day-) | 1.7(1-3day) 0.8(4day-) |
| Volume of granule (L) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Purpose of the experiment | | Confirmation of the upper limit of influent NO ₂ -N conc. | Confirmation of the upper limit of influent NO ₂ -N conc. | Confirmation of the upper limit of influent NO ₂ -N conc. and the effect of residual high NO ₂ -N conc. | Confirmation of the effect of residual high NO ₂ -N conc. | Confirmation of the effect of residual high NO ₂ -N conc. |

入口 pH を 7.0~7.2 に、リアクターの温度を 29~31℃ に調整した。基質に用いた無機合成培地は Table 5-3 と同様であり、NH₄-N 濃度、NO₂-N 濃度を適宜変更した。Run①~③の初期流入量は 2.5~2.8L/h、この時のリアクターの HRT は 1.25~1.40h、上向流線速度 (LV) は 1.30~1.45m/h である。Run①~③では体積 1L の Anammox グラニュールを用い、それぞれ基質 (NH₄-N:NO₂-N) 濃度を 100:120mgN/L、200:240mgN/L、300:360mgN/L に設定した。Run④~⑥では、処理水に NO₂-N 濃度を残存させ、グラニュールベッド全体が高濃度の NO₂-N に暴露された時の応答を観察するため、グラニュール 0.5L を用い、処理水中 NO₂-N 濃度を 100~150mgN/L、200mgN/L 以上となるよう運転を行った。初期流入量は 1.7L/h とし、その後処理水 NO₂-N 濃度が設定値となるよう変更した。分析方法には 5-2-3 に示す方法を用いた。

5-2-5 Anammox グラニュールの NO₂-N への暴露の影響

暴露される NO₂-N 濃度の違いによる活性変化を調べるため、以下の回分実験を行った。

ガス圧測定用セパラブルフラスコに NO₂-N と NO₃-N を含む合成培地を 400ml 添加し、Anammox グラニュールを約 50ml 入れて 30℃ の恒温槽中に静置した。NO₂-N 濃度は 20、100、200、300mgN/L の 4 段階とし、NO₃-N 濃度は 180~240mgN/L とした。合成培地のその他の組成は Table5-2 に示すものと同様とした。暴露中の槽内 NO₂-N 濃度を設定濃度に保つため、Anammox 反応により NO₂-N が消費されないよう培地内に NH₄-N は添加しなかった。NO₃-N の添加は、万が一 NO₂-N が全量消費された場合でもグラニュールが完全嫌気状態に暴露されないことを意図したものである。1 日、2 日経過後に 20、

300mgN/L に暴露させたグラニューール、7 日経過後に全ての濃度条件のグラニューールの活性を測定した。測定時には培地を $\text{NH}_4\text{-N}$ (50~100mgN/L) と $\text{NO}_2\text{-N}$ (35~65mgN/L) を含む新しいものと入れ替えた。

活性測定には、リアクター内部の圧力変化を測定することによりガスの発生速度を算出するガス圧測定装置を用いた。装置図を Fig.5-2 に示す。反応槽は密閉可能なセパラブルフラスコであり、反応槽内の圧力は耐環境小型圧力センサ AP-52A (キーエンス社) で常時測定され、データ収集システム NR-110 および付属ソフト FLEX LOGGER/EX (キーエンス社) によりコンピュータに記録される。反応槽内の圧力が設定値 (5kPa) を超えると圧力センサから出力信号が発せられ、接続されている電磁弁が開き槽内に蓄積したガスを排出する。反応槽内の圧力が設定値 (0.5kPa) まで下がると電磁弁が閉じ、再びガス発生により圧力が増加する。この方法により連続的なガス発生量の測定が可能となる。反応容器内はスターラーにより攪拌される。温度条件を一定に保つため、反応容器は水温 30°C に設定した恒温水槽に入れる。また、外気温の影響を避けるため、反応槽、水槽、圧力センサ、電磁弁、配管は全て恒温室内に設置し、パネルヒーターにより $30 \pm 1^\circ\text{C}$ に制御した。

ガス発生速度から換算した Anammox 活性が妥当な値であることを確認するために、ガス圧測定の前後にサンプリングを行い内部液の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を測定した。また、VSS 当たりの速度で評価するため実験後に MLSS および MLVSS を測定した。

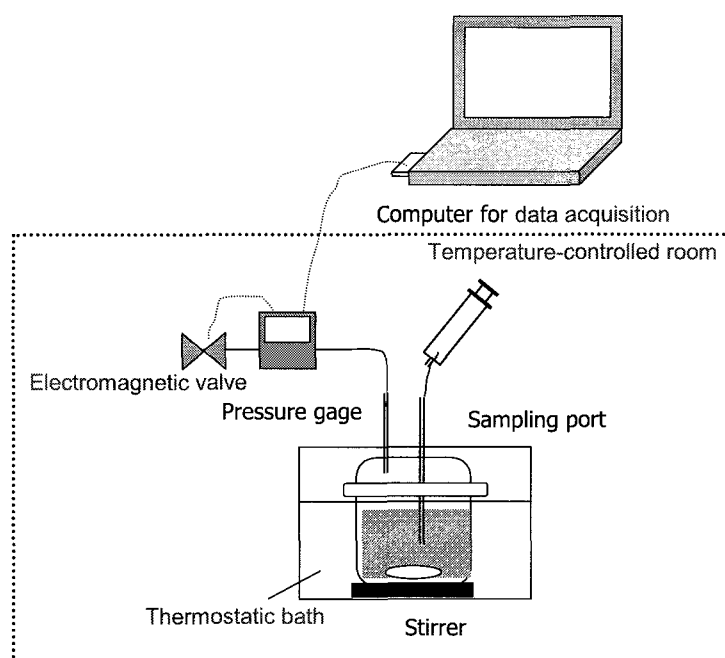


Fig.5-2 Pressure measuring equipment

第 3 節 実験結果および考察

5-3-1 温度の影響

Fig.5-3 に 23、27、30、33、35°C における培地中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 量の変化を示す。さらに、実験後に測定した VSS 値から VSS 当たりの $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度を算出した値の Arrhenius plot を Fig.5-4 に示す。近似直線の R^2 値は 0.8085 と低いが、本結果からの反応エネルギー E は 56.3kJ/mol と算出された。文献によると Anammox 反応の活性化エネルギーは 70kJ/mol (アンモニア酸化反応 68kJ/mol、亜硝酸酸化反応 44kJ/mol) であり、実験結果はこれと比較すると小さい。Arrhenius の式は、以下のように表され、反

応エネルギーの大きさによって温度影響の受け方が異なることがわかる。反応エネルギーが小さいということは、温度の影響の受け方が小さいことを意味する。

$$k = A e^{(-E/RT)} \quad (5-1)$$

k : 反応速度定数 [ML⁻³T⁻¹(0次式), T⁻¹(1次式), M⁻¹L³T⁻¹(2次式)]

E : 活性化エネルギー [ML²T⁻²mol⁻¹, J/mol]

A : 頻度因子 [-]

R : 気体定数 [ML²T⁻²K⁻¹mol⁻¹, J/(K·mol)]

T : 温度 [K]

k_1 、 k_2 を温度 T_1 、 T_2 における反応速度定数とすると

$$E = \{R T_1 T_2 / (T_1 - T_2)\} \ln (k_1 / k_2) \quad (5-2)$$

既報の値は懸濁状態で得た値であり、本実験の値は生物膜状態であることに条件の違いがある。生物膜と懸濁状態の微生物への温度影響の違いを考える場合、基質の拡散移動が重要な役割を持つ。懸濁状態で温度の影響を受けるパラメータは増殖速度のみであるのに対し、生物膜状態では水の粘度、水中および生物膜中の基質の拡散係数も温度の影響を受ける。生物膜と懸濁状態の硝化菌の硝化速度の温度影響を、モデル式の計算と実験によって比較した Zhu ら(2002)の報告によると、酸素の影響をなくし、アンモニアを制限要素とした場合、増殖速度の温度影響が懸濁状態と比較して小さくなるため(20℃において生物膜での増殖速度の影響は懸濁状態での場合と比較して27.3%の大きさであった)、水の粘度、拡散係数を合わせた全ての温度影響の大きさは、生物膜状態の方が懸濁状態より小さく(44.6%) になった³⁾。Anammox 微生物の場合にもこの考え方が当てはまるとすると、既報値との差は微生物の存在形態の違いによるものと推察される。

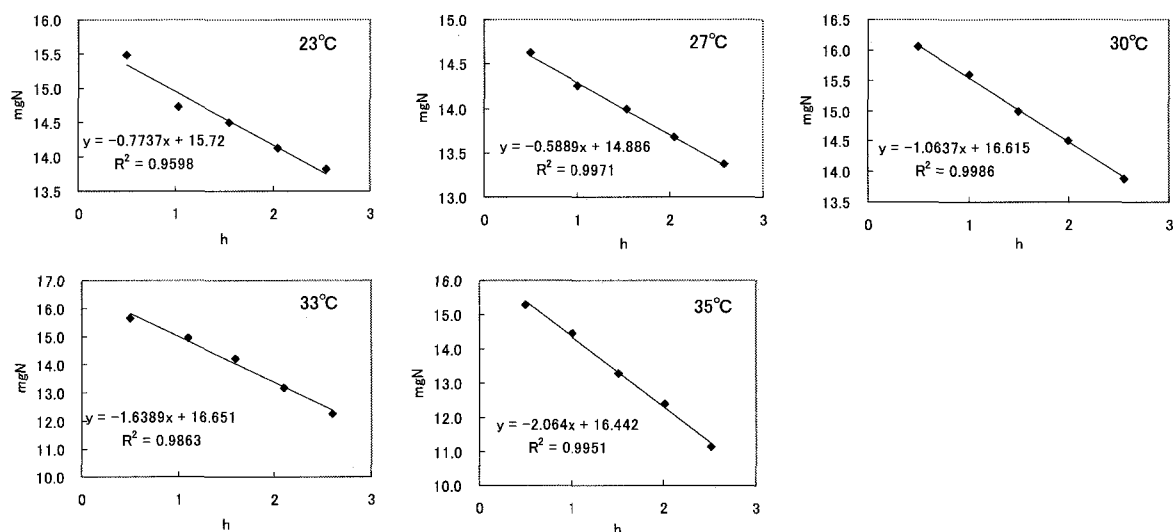


Fig.5-3 Changes on NH₄-N content under various temperature (Y axis: NH₄-N content=NH₄-N concentration × medium volume)

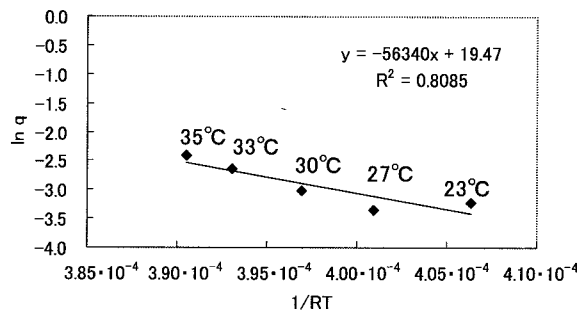


Fig.5-4 Arrhenius plot (q : $\text{NH}_4\text{-N}$ removal rate ($\text{gNH}_4\text{-N/gSS/d}$))

5-3-2 0次反応の濃度範囲

Fig.5-5 に実験結果を示す。上段には濃度変化を、下段には濃度に培地量を乗じた窒素量の変化を示す。下段グラフ中の直線から外れる濃度（図中○で示す）を上段のグラフから読みとり、その濃度が0次反応の下限値と判断した。本実験より、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は $>2.2\text{mgN/L}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度は $>4\text{mgN/L}$ において Anammox 反応を0次反応として扱え得るという結果を得た。既報では、懸濁状態の Anammox 微生物の基質飽和定数 (K_s) は、 $0.07\text{mg NH}_4\text{-N/L}$ 、 $<0.1\text{mg NO}_2\text{-N/L}$ である^{2,4)}。グラニューールの状態での K_s は基質の拡散速度の影響により懸濁状態よりも大きい値となることは妥当な結果であると言える。2~ 4mgN/L 以下まで処理する場合のモデル計算には Monod 式を用いる必要があるが、リアクターの能力を概算するには0次式で問題ないと思われる。

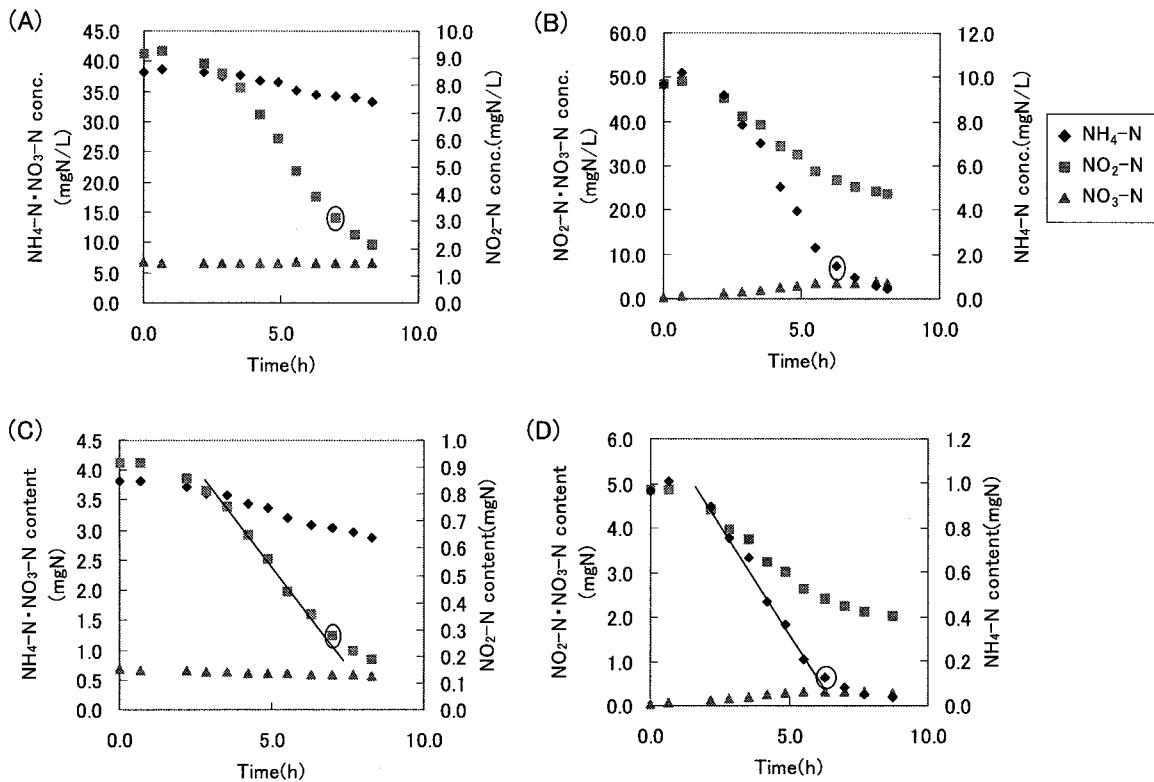


Fig.5-5 Effect of nitrogen concentration on nitrogen removal rates: (A) change of nitrogen concentration under $\text{NH}_4\text{-N}$ limitation, (B) change of nitrogen concentration under $\text{NO}_2\text{-N}$ limitation, (C) change of nitrogen content under $\text{NH}_4\text{-N}$ limitation, (D) change of nitrogen content under $\text{NO}_2\text{-N}$ limitation)

5-3-3 pHの影響

流入基質の pH を変化させたときの流入水と処理水の窒素濃度の経時変化およびリアクターの窒素除去速度の経時変化について、酸性条件の 5.74~7.03 の範囲で変化させたときの結果を Fig.5-6 に、アルカリ性条件の 6.97~8.97 の範囲で変化させたときの結果を Fig.5-7 に示す。窒素除去速度のグラフ中に示す NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N はそれぞれ、NH₄-N 消費速度、NO₂-N 消費速度、NO₃-N 生成速度を表している。入口 pH、出口 pH と窒素除去速度の変化を Table 5-5 にまとめ、入口 pH・出口 pH と NH₄-N 除去速度のとの関係およびその pH 値における除去速度の増減を Fig.5-8 に示す。

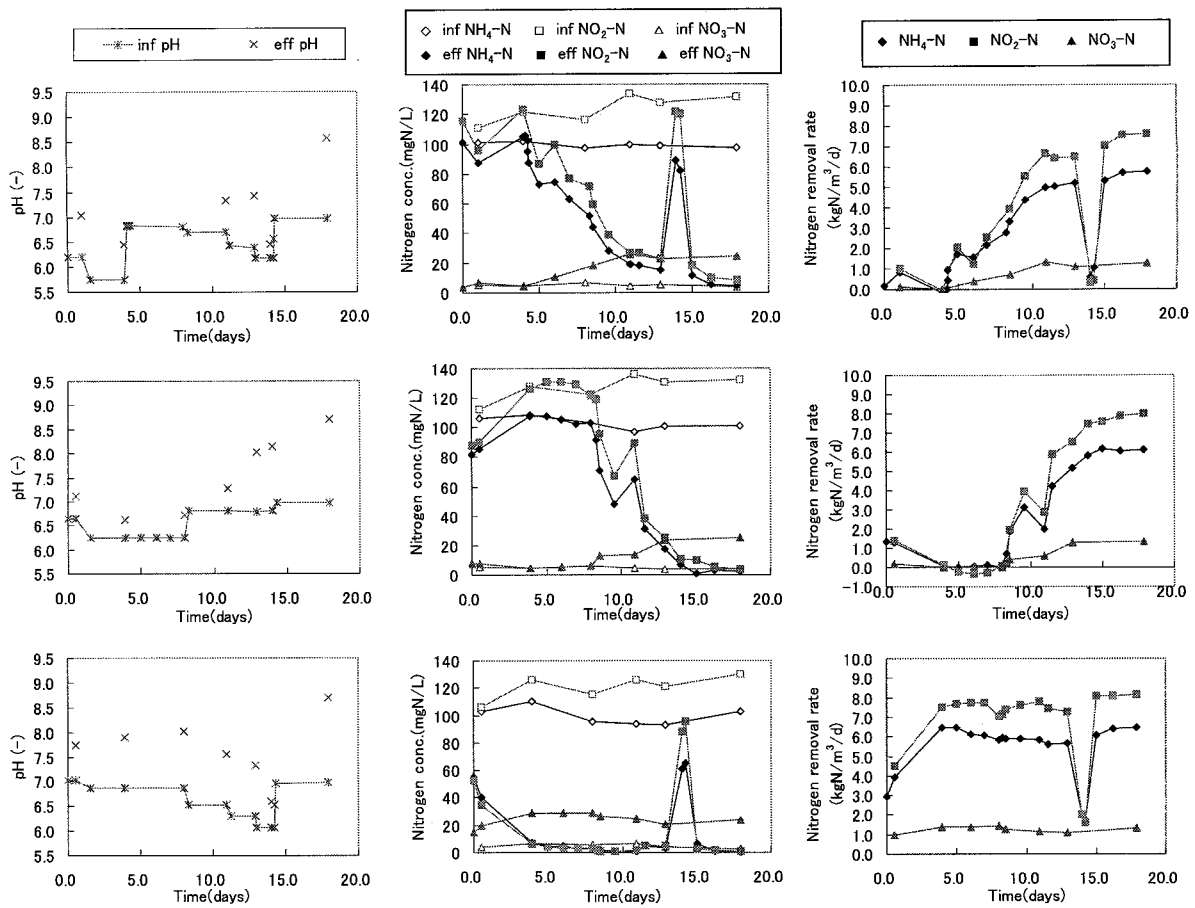


Fig.5-6 Changes in nitrogen concentration and nitrogen removal rates in series 1~3 experiments (Series1: pH 6.19→5.74→6.80→6.69→6.42→6.18→6.97, Series2: pH 6.64→6.24→6.81→6.97, Series3: pH 7.03→6.86→6.53→6.30→6.08→6.98)

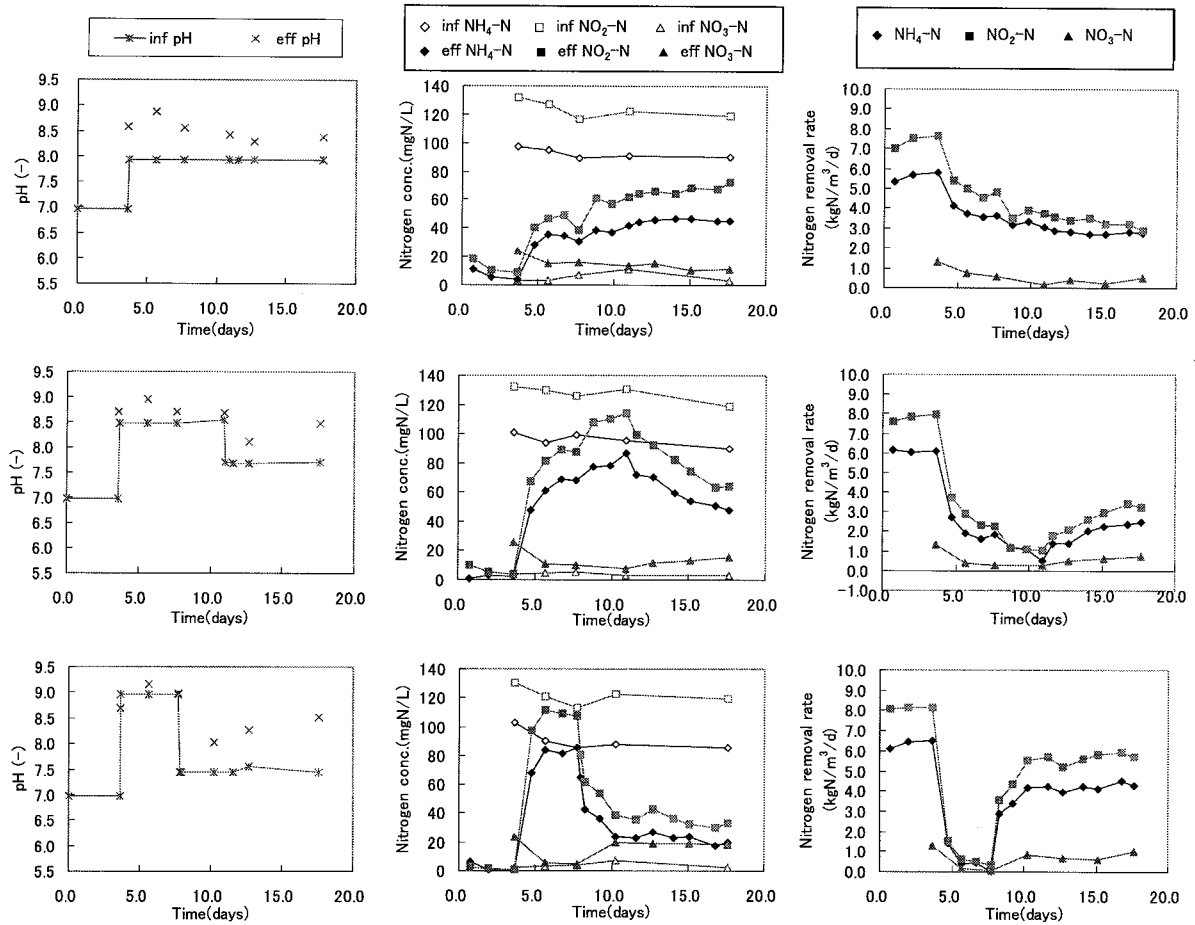


Fig.5-7 Changes in nitrogen concentration and nitrogen removal rates in series 4~6 experiments (Series4 : pH 6.97→7.92, Series5 : pH 6.97→8.48→7.70, Series6 : pH 6.97→8.97→7.45)

Table 5-5 Changes of nitrogen removal rates at various influent pH

| Influent pH | Effluent pH | Change of nitrogen removal rate |
|-------------|-------------|-------------------------------------|
| 5.74 | 6.44 | Decrease to 0 kgN/m ³ /d |
| 6.08 | 6.54-6.6 | Decrease |
| 6.18 | 6.46-6.57 | Increase |
| 6.19 | 7.03 | Decrease |
| 6.24 | 6.63-6.72 | Decrease to 0 kgN/m ³ /d |
| 6.30 | 7.33 | Increase |
| 6.42 | 7.42 | Increase |
| 6.53 | 7.55 | Increase |
| 6.64 | 7.11 | Increase |
| 6.69 | 7.33 | Increase |
| 6.80 | | Increase |
| 6.81 | 7.27-8.15 | Increase |
| 6.86 | 7.91-8.02 | Constant |
| 7.03 | 7.75 | Increase |
| 6.97 | 8.58-8.71 | Increase |
| 7.45 | 8.03-8.52 | Increase |
| 7.70 | 8.12-8.47 | Increase |
| 7.92 | 8.28-8.86 | Decrease |
| 8.48 | 8.69-8.95 | Decrease |
| 8.97 | 8.99-9.16 | Decrease |

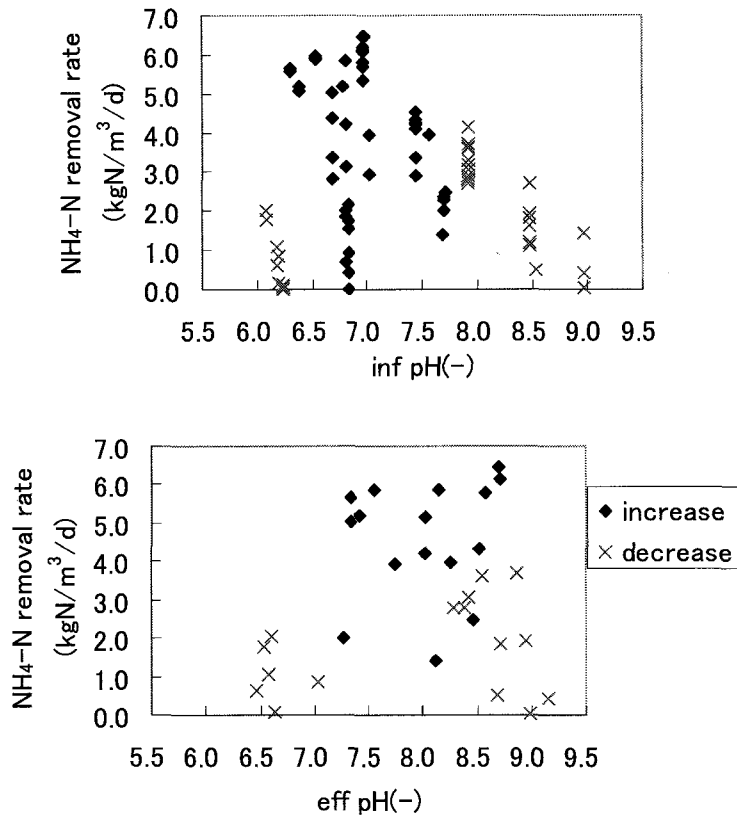


Fig.5-8 Relationship between influent pH, effluent pH and NH₄-N removal rate

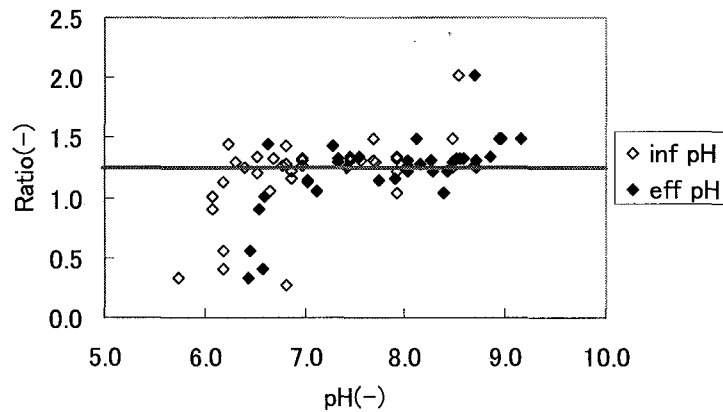


Fig.5-9 Relationship between influent pH, effluent pH and ratio of NO₂-N removal to NH₄-N removal

流入および流出 pH の変化にともない、NH₄-N 除去量に対する NO₂-N 除去量の割合が変化した。Fig.5-9 に示すように、低 pH では低くなり高 pH では高くなる傾向があった。したがって、酸性側への pH 変化の影響は NH₄-N 除去よりも NO₂-N 除去の方が大きく、逆にアルカリ性側への影響は NO₂-N 除去よりも NH₄-N 除去の方が大きく受けることが示唆された。

実験結果より、以下のことが明らかになった。

- NH₄-N 除去速度が高い値で維持されているとき、入口 pH を徐々に下げていくと、NH₄-N 除去速度の低下は pH6.3 未満になった時に急激に起こった。

- ・ 入口 pH6.3 では Anammox 活性は維持され、わずかながら上昇傾向がみられた。入口 pH6.4 以上では $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度の上昇がみられ、グラニュール体積あたり $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度約 $5\text{kgN/m}^3/\text{d}$ 以上に達した。pH6.81、7.03 においても長期間運転すれば達したと予想される。
- ・ Anammox 活性が低下した時の出口 pH は 7.0 以下であった。

入口 pH が低くても、底部のゾーンでわずかでも Anammox 反応が起これば pH が上昇し、次のゾーンでは Anammox 反応に適した pH に近付くため反応速度がより大きくなる。このサイクルにより、入口 pH が至適 pH 範囲より低くても、グラニュールベッド上部には反応に適した pH ゾーンが形成されることが考えられる。このサイクルが働く間は処理速度が維持されるが、入口 pH が境界値以下では、底部の Anammox 反応速度が遅く、pH の上昇が起こらないために、グラニュールベッド内に至適 pH ゾーンが形成できなくなり、処理速度の急激な悪化を起こすと考えられる。本実験結果より、入口 pH は 6.3 以上であること、グラニュールベッド内に pH 7.0 以上のゾーンを確保することが必要であると言える。

Fig.5-6～5-7 中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度の変化を見ると、入口 pH6.97 において $5.8\sim 6.5\text{kgN/m}^3/\text{d}$ であった状態から pH を 7.92、8.48、8.97 に変更したとき、変更後 1 日後の $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度は各々変更前の 71.6、44.3、22.0% であった。その後速度はさらに低下し、47.0% (pH7.92 : 10 日後)、8.2% (pH8.48 : 7 日後)、0.4% (pH8.97 : 4 日後) まで低下した。

実験結果より、以下のことが明らかとなった。

- ・ 入口 pH7.9 以上では $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度の低下がみられた。変更後の pH が高いほど、変更直後の $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度の低下が大きく、高 pH 条件を維持するとさらに経時的に低下した。
- ・ 入口 pH と $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度には明確な相関関係があり、pH が高い程 $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度が低い。
- ・ 出口 pH には、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度との相関関係はみられなかった。

Anammox 反応により pH が上昇し、グラニュールベッド内の pH が Anammox 反応の至適 pH 範囲を超える値まで上昇すると反応が停止すると考えられる。Fig.5-8 で入口 pH が低いほど処理速度が高いのは、入口 pH と反応上限の pH 値までの差が大きいため、許容される反応量が多いためと考えられる。回分実験による既報のデータでは、Anammox 反応の上限は pH9.0 である。本実験では、入口 pH8.5 でも 7 日間で処理速度が 10 分の 1 以下 (その時の出口 pH8.69) となった。

次に、pH の値が至適範囲を外れた場合に、設定値を元に戻した時の回復速度を調べた。入口 pH を 3 日間 5.74 とした後、6.83 に変更した時の 6 時間の $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度の変化を Fig.5-10 に示す。

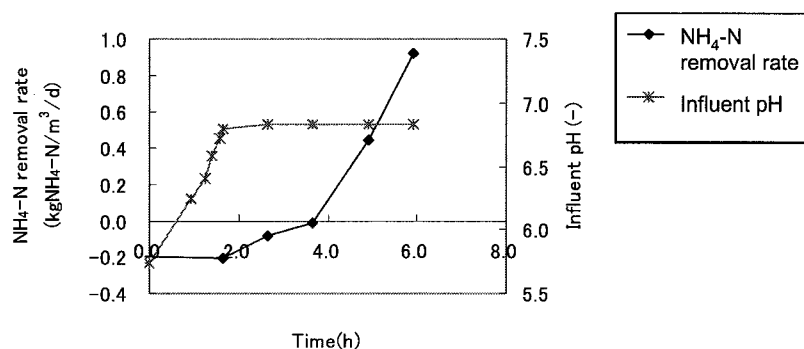


Fig.5-10 Transition of nitrogen removal rate after the change of influent pH from 5.74 to 6.83

入口 pH が 5.74 の時、処理水 NH₄-N 濃度が流入水の NH₄-N 濃度を上回り、NH₄-N 除去速度の計算値は 0 以下となっていた。pH 計の設定値変更後、入口 pH は 1.8h 後に設定値の 6.83 になった。NH₄-N 除去速度は pH が 6.83 となってから 2 時間後にプラスに転じ、その後急激に上昇した。Fig.5-6 中 Series1 の 14~15 日目をみると、pH6.18 から pH6.97 に変更した時においても、一日後には NH₄-N 除去速度が回復している。これらの結果より、低 pH によって活性が一時的に低下した場合でも、pH を 7 付近に戻すことにより、数時間から 1 日で Anammox 活性の回復することが示された。

同様に、Fig.5-7 中 Series6 の実験後、入口 pH を 7.92 から 7.02 に変更した時の処理速度の変化を観察した結果、pH6.98 における図中 4 日目の最大処理速度に対し、変更後 2 日目に 72%、3 日目に 88% に回復した。これにより、約 2 週間の高 pH 条件によって処理速度が低下した場合でも、pH を 7 付近に戻すことにより 2~3 日で回復することが確認された。

実験期間中、処理水の SS (浮上したグラニューールは除く) は 0.1~4.3mg/L で推移した。SS 濃度は NH₄-N 除去速度とやや相関関係がみられ、酸性側、アルカリ側ともにほぼ同じ値であった (Fig.5-11)。

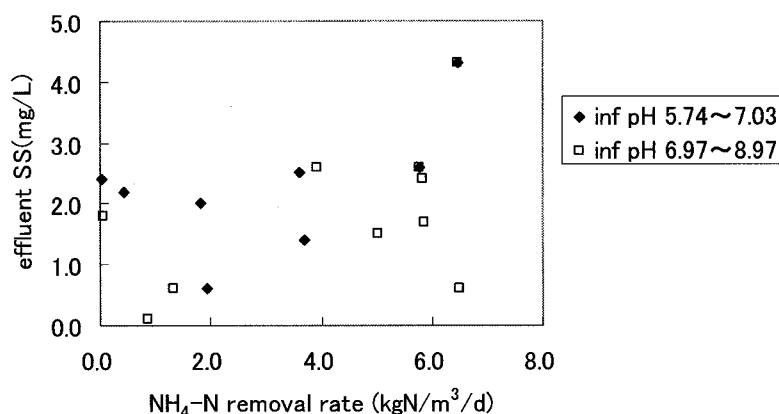


Fig.5-11 Relationship between effluent SS concentration and NH₄-N removal rate

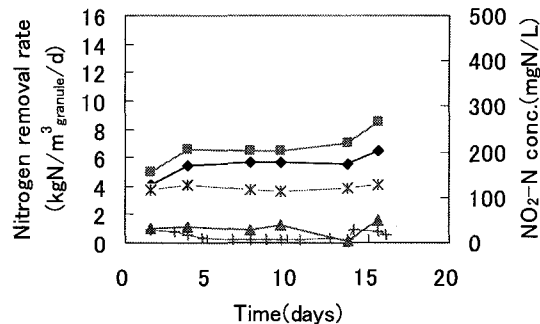
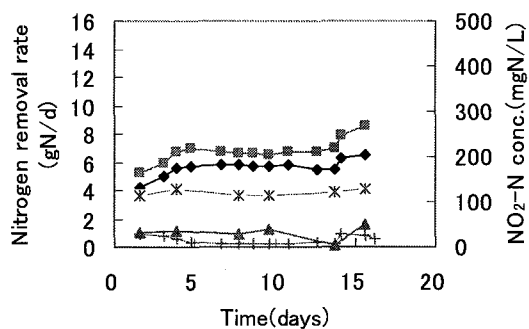
5-3-4 高濃度 NO₂-N 添加時のリアクターの処理速度

Run①~⑥の流入水および処理水の NO₂-N 濃度とリアクターの窒素除去速度 (gN/d) の経時変化、およびグラニューール体積当たりの窒素除去速度 (kgN/m³_{granule}/d) の経時変化を Fig.5-12 に示した。図中 NH₄-N、NO₂-N は除去速度を、NO₃-N は生成速度を示す。また、結果を Table 5-6 にまとめた。

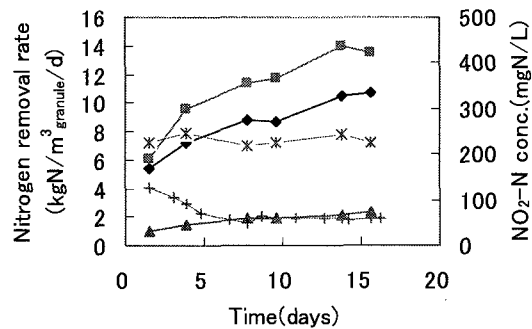
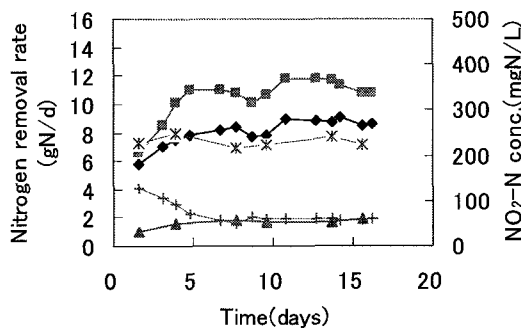
グラフより、Run①、②、③を比較すると、NH₄-N 除去速度、NO₂-N 除去速度は入口濃度が高いほど高くなった。リアクター全体の窒素除去速度は大きく変化しなかったが (左側グラフ)、見かけのグラニューール体積が 16 日間でそれぞれ 0.07L、0.33L、0.40L 減少したため、グラニューール体積当たりの除去速度は上昇した (右側グラフ)。Run①、②は NO₂-N/NH₄-N の比の変動幅が 0.18、0.22 であったが、Run③では NH₄-N 除去速度がほぼ一定であるのに対し、NO₂-N 除去速度が不安定であったため、変動幅が 0.54 と大きくなった。より高濃度条件の Run④においては、NO₂-N 濃度を 100mgN/L 台から上げた直後から NH₄-N 除去速度が低下した。NO₂-N 除去速度は濃度を上げた直後は上昇したが、その後低下した。速度の低下は、NH₄-N 除去速度よりも NO₂-N 除去速度の方が顕著であり、NO₂-N/NH₄-N 比率は通常の 1.2~1.3 付近から大きく低下し、実験終了時には 1 を下回った。流入 NO₂-N 濃度を Run④と同程度とし、処理水濃度を 200mgN/L 以上に高く設定した Run⑤においては、Run④と比較して NH₄-N

除去速度は平均 32.5%、NO₂-N 除去速度は 30.5%低くなった。NO₂-N/NH₄-N 比率はより早い時点で 1 を下回った。グラニューール体積の変化は Run④が 0.1L の減少だったのに対し Run⑤では 0.15L 減少した。グラニューール体積あたりの NH₄-N 除去速度、NO₂-N 除去速度は、Run⑤の方が Run④よりも約 20% 低い値を示した。流入水の NO₂-N 濃度を Run④、⑤より低い 260~327mgN/L とし、処理水 NO₂-N 濃度を約 200mgN/L とした Run⑥では、リアクターの NH₄-N 除去速度は濃度を変更した図中 4 日目以降ゆるやかな上昇傾向がみられたが、NO₂-N 除去速度は 7 日目から大きく低下し、その後 10 日目以降はほぼ一定の値となった。NO₂-N/NH₄-N 比率は 0.67 まで低下し、グラニューール体積は 0.14L 減少した。流入濃度がほぼ同程度の Run③と Run⑥を比較すると、Run⑥では NO₂-N 除去速度の低下が Run③と比較して顕著であり、NO₂-N/NH₄-N 比も大きく低下している。処理水 NO₂-N 濃度の高さがより阻害の影響を強めたと推察される。

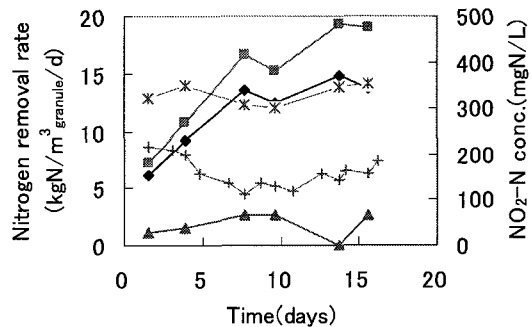
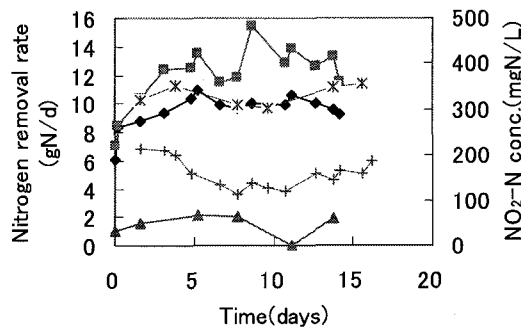
Run ①



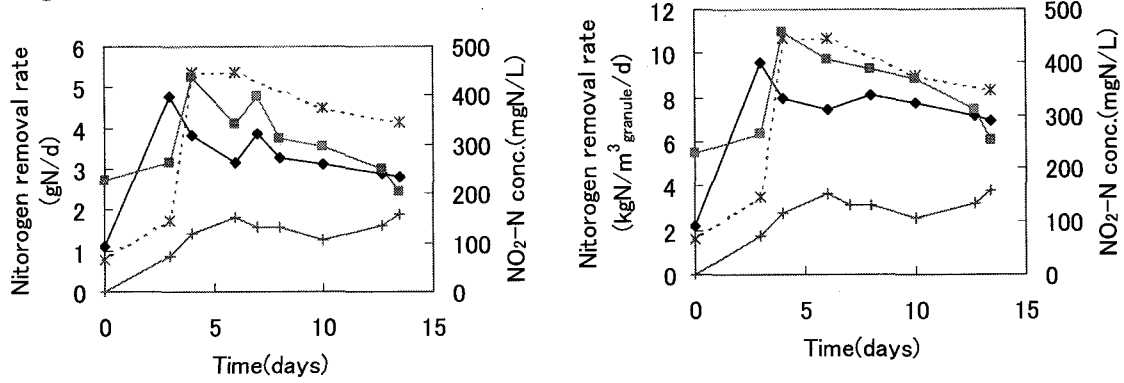
Run ②



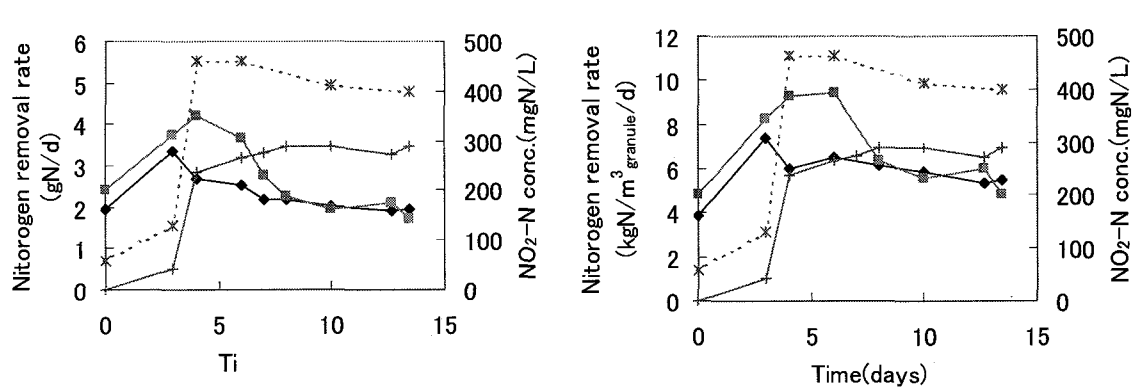
Run ③



Run ④



Run ⑤



Run ⑥

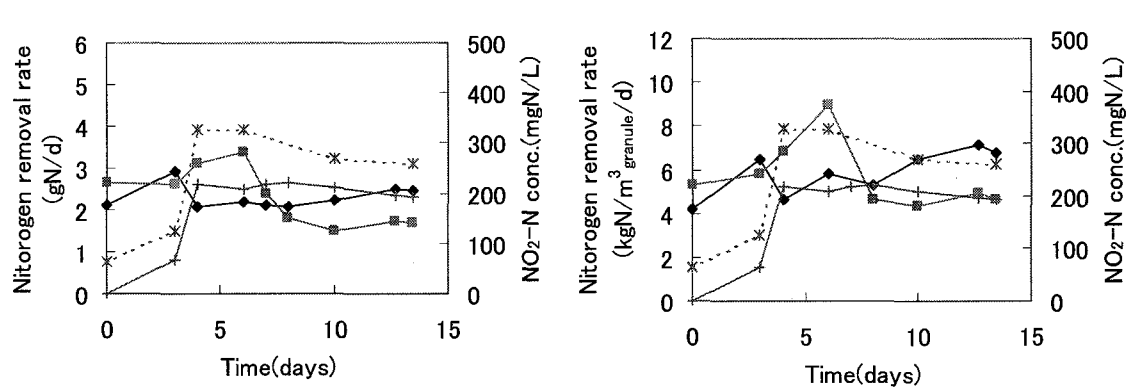


Fig.5-12 Nitrogen removal performances under various influent NO₂-N and effluent NO₂-N concentrations; ◆:NH₄-N removal rate, ■:NO₂-N removal rate, ▲:NO₃-N production rate, *:influent NO₂-N concentration, +:effluent NO₂-N concentration

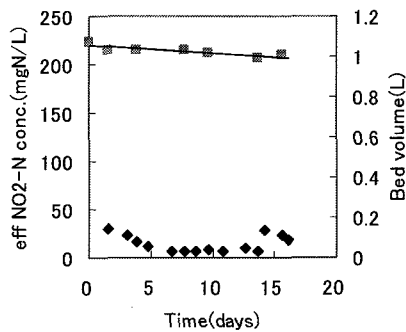
本実験より、NH₄-N 除去速度と NO₂-N 除去速度に対する NO₂-N 濃度の障害の程度は異なっており、NO₂-N 除去速度がより低濃度で障害を受けることが示唆された。また、障害の影響のない濃度範囲（約 100mgN/L 以下）をリアクター内に多く確保すれば、約 300mgN/L までの流入 NO₂-N 濃度を受け入れることができることが示された。内部に濃度差があるグラニュールリアクターの運転において処理速度の低下を防ぐためには、最も高い部分の NO₂-N 濃度を 300mgN/L 以下とし、かつ運転中の処理水 NO₂-N 濃度を 100mgN/L 以下のできる限り低い濃度にする必要がある。

Table 5-6 Effects of influent and effluent NO₂-N concentrations on nitrogen removal performances

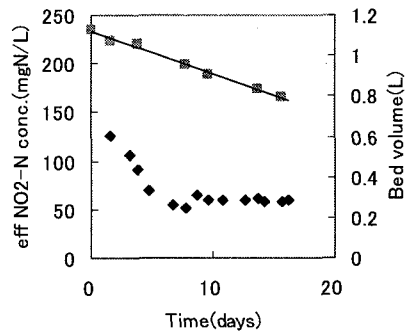
| Run | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ |
|---|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Influent NO ₂ -N (mgN/L) | 115-129 | 218-247 | 302-354 | 347-446 | 398-462 | 260-327 |
| Effluent NO ₂ -N (mgN/L) | 6.5-30 | 51-126 | 111-216 | 106-159 | 238-290 | 193-221 |
| NH ₄ -N removal (kgN/m ³ _{granule} /d) | 4.03-6.49 Increase | 5.38-10.73 Increase | 6.20-14.78 Increase | 6.96-8.13 Decrease | 5.37-6.51 Decrease | 4.61-7.13 Increase |
| NO ₂ -N removal (kgN/m ³ _{granule} /d) | 5.04-8.56 Increase | 6.10-10.73 Increase | 7.26-19.28 Increase | 6.08-10.96 Decrease | 4.86-9.46 Decrease | 4.35-8.95 Increase→ Decrease |
| NO ₂ -N/NH ₄ -N (-) | 1.14-1.32 Stable | 1.13-1.35 Stable | 1.01-1.55 Unstable | 0.87-1.38 Decrease | 0.89-1.56 Decrease | 0.67-1.55 Unstable |

Run①、②、③のグラニュール体積の経時変化を Fig.5-13 に示す。処理水 NO₂-N 濃度が 30mgN/L 以下の Run①においては、少量のグラニュールの浮上が観察されるものの、グラニュール体積の大幅な減少傾向は見られなかったが、Run②、③においてはグラニュールの浮上・流出が観察され、グラニュール体積が減少した。減少速度を線形近似すると、その傾きは Run①0.004、Run②0.021、Run③0.024(L/day)と計算された。グラニュールの浮上はリアクター内の基質濃度が高いほど多いと言える。処理水中に基質が残存する状態で運転を継続すると、グラニュールの浮上によりリアクター内に保持されるグラニュール量が減少する。その結果、汚泥負荷がさらに上昇し、リアクターの処理能力の低下および処理水質の悪化に繋がると予想される。浮上したグラニュールはガスを内包しており、水流の衝撃では沈降しなかった。

①



②



③

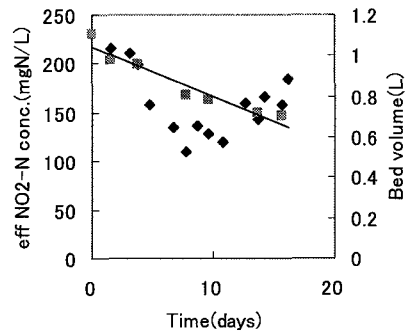


Fig.5-13 The change of volume of granule and effluent NO₂-N concentration; ◆:effluent NO₂-N concentration, ■:granule bed volume

グラニューール体積あたりの流入 NO₂-N 負荷とグラニューール体積あたりの NO₂-N 窒素除去速度との関係を Fig.5-14 に示す。両者には相関関係が見られた。運転期間中のグラニューール体積あたり最大 NO₂-N 除去速度は 19.3kgN/m³/d (最大 TN 除去速度は 31.1kgN/m³/d) であったが、NO₂-N 除去率 90%以上を達成するグラニューール体積あたりの NO₂-N 負荷の上限は 8.0kgNO₂-N/m³_{granule}/d (この時 TN 除去速度最大値は 12.9kgN/m³_{granule}/d) であった。

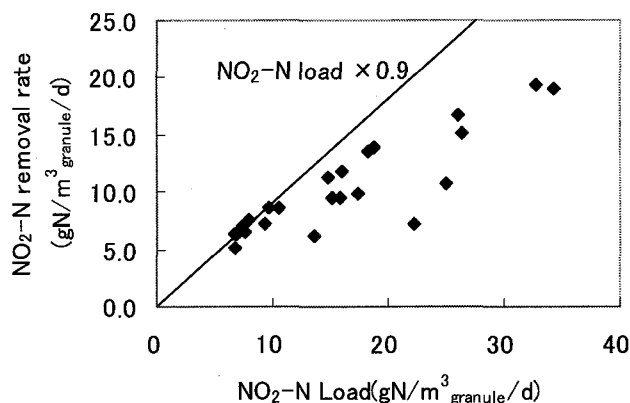


Fig.5-14 The relationships between NO₂-N load and NO₂-N removal rate

流入 NO₂-N 濃度と流入量を変え、ほぼ同じ汚泥あたり NO₂-N 負荷量を与えた時の汚泥あたり NO₂-N 除去速度に及ぼす流入 NO₂-N 濃度の影響を Fig.5-15 に示した。同負荷量であればこの範囲内での流入 NO₂-N 濃度の違いは汚泥あたりの NO₂-N 除去速度に影響を与えないことが示された。ただし、流入 NO₂-N 濃度が 300mgN/L 以上になると NO₂-N 除去速度が不安定になる傾向があることに留意すべきである。

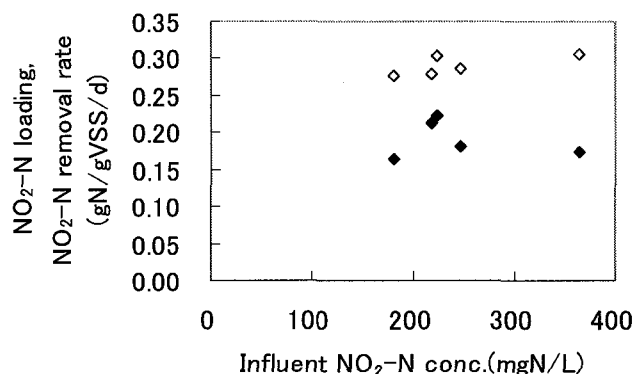


Fig.5-15 Nitrogen removal rate at the same load with various NO₂-N concentration; ◇: NO₂-N loading, ◆: NO₂-N removal rate

流入水および処理水中 NO₂-N 濃度と処理水 SS 濃度の関係を Fig.5-16 に示した。処理水中の SS 濃度は 0.8~5.7mg/L であり、流入水および処理水 NO₂-N 濃度との相関は見られなかった。

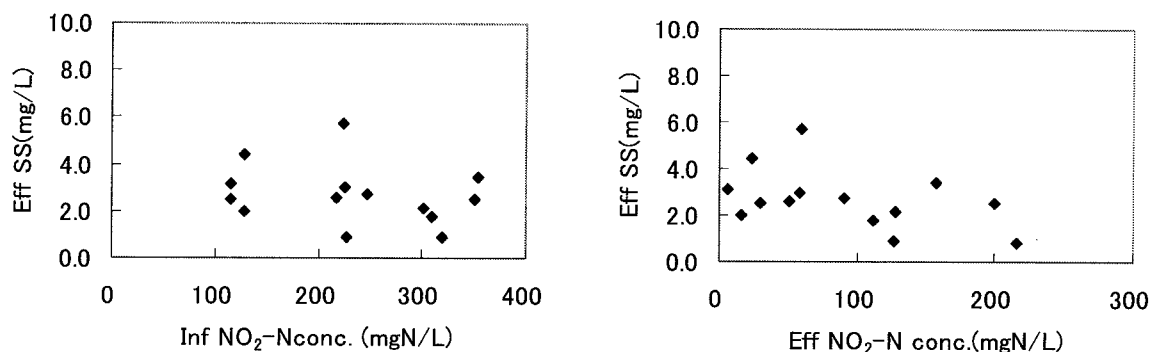


Fig.5-16 The effluent SS concentration and influent and effluent NO₂-N concentration

5-3-5 反応停止状態における Anammox グラニュールの NO₂-N への暴露の影響

ガス圧測定装置による圧力変化の測定結果（累積値に換算後）の一例を Fig.5-17 に示す。左のグラフはコンピュータに取り込まれた電圧値に、圧力-電圧の検量線で求めた係数を掛けて圧力値に換算したものである。右のグラフは圧力変化の傾きをプロットしたものである。この傾きの値に、ガス体積-圧力の検量線で求めた係数を掛けることにより、ガス発生速度を算出する。

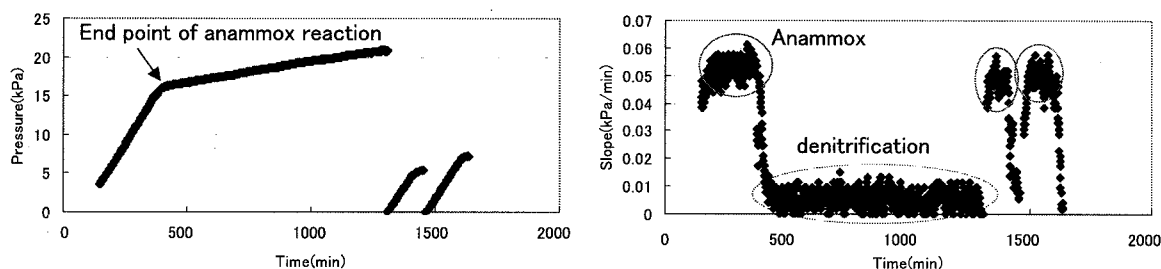


Fig.5-17 An example of the measurement results of the gas pressure change; left: accumulation value of the pressure change, left: the change of slope (a 10-minute average)

系内の NO₂-N が完全に消費されると、圧力変化の傾きは明らかに低くなるが、傾きが 0 とはならなかった。これは脱窒によるガス発生が起こっているためと考えられる。NO₂-N 消費後の圧力変化の傾きから脱窒によるガス発生速度を算出することができる。Anammox 反応が起こっている間にも脱窒反応が起こっていると考え、脱窒によるガス発生速度を差し引いた値を Anammox によるガス発生速度とする。さらに Anammox 活性に換算するためには、Anammox 反応式より 1 モルの NH₄-N から 1.02 モルの N₂ ガスが発生すると考えて、N₂ ガス発生速度を NH₄-N の除去速度に換算する。

3 段階の NO₂-N 濃度に暴露させたグラニュールの活性変化を Fig.5-18 に示す。横軸が NO₂-N への暴露時間、縦軸は VSS あたりの NH₄-N 除去速度の、暴露前の値に対する相対値を示す。

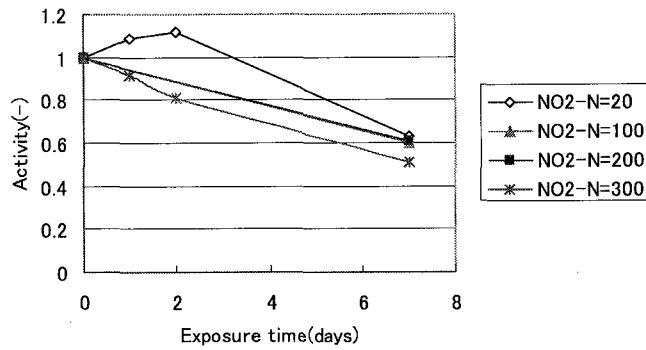


Fig.5-18 The change of activity after exposure to high NO₂-N concentration

最も低濃度条件の NO₂-N 20mgN/L では、2 日目までは初期活性より上昇したが 7 日後には 62.7%に低下した。NO₂-N 濃度 100、200mgN/L の 7 日暴露後活性は 59.9、61.0%と 20mgN/L の場合とほぼ等しかった。NO₂-N 濃度 300mgN/L の場合には活性が時間の経過と共に低下し、1 日後に 91.8%、2 日後に 80.7%、7 日目に 51.2%となった。

この結果より、反応を停止させた状態ではグラニュールの活性が低下すること、保存する場合の NO₂-N 濃度は 200mgN/L までは阻害の影響がみられないこと、300mgN/L の条件でも 7 日間の暴露では初期活性の約 1/2 の活性を有し、失活することはないことが示された。したがって、何らかの理由によりグラニュールの反応を停止させる必要がある場合には、NO₂-N 濃度は 200mgN/L 以下にし、再立ち上げの際には保存中に活性が低下することを考慮する必要がある。また、データには示さないが NO₂-N、NO₃-N が消費され完全嫌気条件になると、自己分解と酵素に含まれる鉄の還元によると推察されるグラニュールの黒色変化が起こり、完全に Anammox 活性が失われることから、完全嫌気状態を避けるための手段を講じることが必要である。

第 4 節 結語

23~35°Cの範囲で影響を調べた結果、Anammox 反応に関する活性化エネルギー (E) は 56.3kJ/mol と算出された。懸濁状態で測定された既報の値 70kJ/mol より小さい値となったのは、Anammox 微生物がグラニュールで存在しており、基質の拡散が温度の影響を受け、かつ増殖速度が懸濁状態と比較すると小さくなるためではないかと推察される。回分実験によりグラニュールでの Anammox 反応は NH₄-N・NO₂-N が 2~4mgN/L までは 0 次反応で表せることが確認できた。

リアクターの反応ゾーン内に、pH7.0~8.5 のエリアをより多く確保することが必要である。Anammox 反応により pH が上昇することを考慮し、上向流式のリアクターの場合には上部の pH を 8.5 以下になるよう底部 pH を設定する必要がある。その設定値は 6.3 以上とする。低部の pH 条件が低い場合 (<6.3) も、高い場合 (>7.9、出口 pH>8.28) も、NH₄-N 除去速度の低下は低部 pH を 7 付近に戻すことにより数時間から 2~3 日以内に回復した。NH₄-N 除去と NO₂-N 除去に対する pH の影響が異なることが示唆された。酸性側への pH 変化の影響は NH₄-N 除去よりも NO₂-N 除去の方が大きく、逆にアルカリ性側への影響は NO₂-N 除去よりも NH₄-N 除去の方が大きく受けた。Anammox 反応においては、NH₄-N はヒドロキシルアミンとともにヒドラジン加水分解酵素 (ヒドラジン生成酵素) によりヒドラジンへ変換され、NO₂-N は亜硝酸還元酵素によりヒドロキシルアミンに変換される。それぞれ異なった酵素

が関与していることから、本実験での結果の違いは、それぞれの酵素に対する pH の影響が異なっているためではないかと推察される。

Anammox グラニュールを用いた上向流リアクターにおける $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の影響を検討し、以下の結果を得た。流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が 300mgN/L 以上では $\text{NO}_2\text{-N}$ により Anammox 反応が阻害された。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去速度の方がより低濃度から $\text{NO}_2\text{-N}$ の阻害を受けることが示唆された。流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が $300\sim 350\text{mgN/L}$ では $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度は保たれるものの $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去速度が不安定になり、 350mgN/L 以上では $\text{NH}_4\text{-N} \cdot \text{NO}_2\text{-N}$ 両方の除去速度の低下がみられた。高濃度 $\text{NO}_2\text{-N}$ による除去速度の低下は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度より $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去速度の方が顕著で、除去 $\text{NO}_2\text{-N}/\text{NH}_4\text{-N}$ 比率が低下した。処理水中に $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が高濃度で残存すると Anammox 反応が阻害を受けることから、処理水 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度を 100mgN/L 以下のできる限り低い濃度に維持することが望ましい。処理水中に $\text{NO}_2\text{-N}$ が残存する場合において ($>50\text{mgN/L}$)、グラニュールの浮上によるグラニュールベッド体積の大幅な減少が見られた。浮上したグラニュールはガスを内包しており、それを再利用する場合には何らかの方法でグラニュールを破壊し、ガスを放出する必要がある。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率 90%以上を達成するグラニュール体積あたりの $\text{NO}_2\text{-N}$ 負荷の上限は $8.0\text{kgNO}_2\text{-N}/\text{m}^3_{\text{granule}}/\text{d}$ (この時 TN 除去速度最大値は $12.9\text{kgN}/\text{m}^3_{\text{granule}}/\text{d}$) であった。汚泥負荷が同じであれば、流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度 (実験では $181\sim 364\text{mgN/L}$) を変えても汚泥あたりの除去速度は変わらなかった。しかし、流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が 300mgN/L 以上では処理が不安定になることに留意すべきである。

リアクターの基質流入部の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度は約 300mgN/L まで許容可能であり、これ以上の濃い排水を処理する場合には処理水等で希釈する必要がある。グラニュールの大量浮上を防ぐには、窒素除去率を高くして処理水中の基質濃度を下げることが必要であり、そのためには系全体の汚泥あたりの窒素負荷の上限を設定しておく必要がある。汚泥当たりの窒素除去速度はグラニュール中の Anammox 微生物の存在割合によって変化するため、事前にグラニュールの能力評価をしておく必要がある。

反応を停止させた保存状態では、暴露される $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が高いほど、また暴露時間が長いほど活性の低下割合が大きかった。反応を停止させ保存する場合には $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度は 200mgN/L 以下にし、また再立ち上げの際には、保存中に活性が低下することを考慮し負荷を下げ、運転を開始する必要がある。

Anammox グラニュールリアクターの運転条件、特に実際の運転においてトラブルが発生しやすいと予想される温度、pH、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度について、至適範囲および至適範囲を外れた場合の活性への影響について検討した。既報の Anammox 微生物についての報告と比較するといずれも異なる結果となったが、微生物が懸濁状態ではなくグラニュールであるという存在形態の違い、グラニュール中の Anammox 微生物の割合が 100%ではないこと、リアクター内部に基質濃度勾配のある不完全混合リアクターであることなどが理由として挙げられる。実際のリアクターの運転においては、流入水の濃度や pH などの性状の変化、また運転中のトラブルも予想され、グラニュールの保存の必要性も出てくると考えられる。本章で得られた知見はリアクター設計や運転管理に役立つものと思われる。

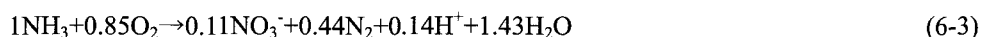
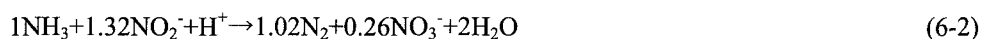
第 5 章参考文献

- 1) Strous,M., van Gerven,E., Zheng,P., Kuenen,J.G. and Jetten,M.S.M. (1997) Ammonium Removal from Concentrated waste Streams with the Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) Process in Different Reactor Configurations, *Water Research*, **31**, 1955-1962.
- 2) Strous,M., Kuenen,J.G., Jetten,M.S.M.(1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(7), 3248-3250.
- 3) Zhu,S. and Chen,S.(2002) The impact of temperature on nitrification rate in fixed film biofilters, *Aquacultural Engineering*, **26**, 221-237.
- 4) Hao X., Heijnen J.J. and Loosdrecht M.C.M. (2002) Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process, *Biotechnology and Bioengineering*, **77**(3), 266-277

第6章 Anammox グラニューールの活用・単一槽型窒素除去リアクターの検討

第1節 概説

一般に、窒素除去プロセスに流入する排水中の窒素は NH_4^+ の形で存在することが多いため、Anammox を窒素除去プロセスに用いる場合には、必ず前段に NH_4^+ の一部を NO_2^- に硝化する部分亜硝酸化が必要となる。最近、部分亜硝酸化と Anammox 反応を単一槽内で行う方法が検討され、CANON (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) 法と名付けられた^{8)~11)}。CANON 法においては、 NH_4^+ が好気性アンモニア酸化菌によって式(6-1)のように部分亜硝酸化され、次に Anammox 微生物によって式(6-2)のように NH_4^+ と NO_2^- が窒素ガスに変換される。反応式をまとめると式(6-3)のようになる。CANON 法は硝化/脱窒法と比較して Anammox による運転コスト削減のメリットを有すると共に、一槽で処理が行えるというメリットを有する。



既報では、2001年に Sequencing Batch Reactor (SBR) を用いて一槽で亜硝酸型硝化と Anammox を行わせることに成功している⁸⁾。SBR 内には Anammox 微生物と硝化菌が混在していることが FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) 法により確認された。Anammox 微生物は酸素により阻害を受けるが、CANON 法が安定して窒素除去を行える理由として、外側に硝化菌、内側に Anammox 微生物が存在し、内側には酸素が浸透せず嫌気条件が保たれるという生物膜モデルが提唱されている¹²⁾。この SBR による窒素除去速度は、アンモニアを過剰に添加した系で $0.08\text{kgN}/\text{m}^3/\text{d}$ 、アンモニア律速の場合には $0.04\text{kgN}/\text{m}^3/\text{d}$ であった。2003年には、二重管型のガスリフトリアクターを用いた CANON 法が報告された¹⁰⁾。Anammox 汚泥をリアクター内で培養し約 $9\text{kgN}/\text{m}^3/\text{d}$ の処理能力を有するまで増殖させた後、アンモニア酸化菌を含む硝化汚泥を添加し、吹き込みガス中の空気の割合を徐々に増加させることにより、窒素除去速度 $1.5\text{kgN}/\text{m}^3/\text{d}$ を 60 日間達成している。 NH_4^+ 濃度約 $1,500\text{mgN}/\text{L}$ の合成排水を用い処理水中に約 $900\text{mgN}/\text{L}$ の NH_4^+ が残存しているため、除去率は 42% と低い。

Anammox の前処理に必要な亜硝酸型硝化は、これまでも硝化/脱窒の際の曝気エネルギー削減および脱窒時の有機物添加量削減を目的として研究が進められてきた。酸素に対する親和性の違い、遊離アンモニア ($0.1\sim 1.0\text{mgNH}_3\text{-N}/\text{L}$ において亜硝酸酸化菌の活性が抑制される) および亜硝酸の阻害効果の差、高温条件 (25°C 以上) での増殖速度の差、アンモニア酸化と亜硝酸酸化の活性化エネルギー ($68\text{kJ}/\text{mol}$, $44\text{kJ}/\text{mol}$) の違いを利用する方法、阻害剤によって亜硝酸酸化菌を抑制する方法等が挙げられ、最近では、グラニューール化した硝化菌を用いたエアリフトリアクターで亜硝酸型硝化に成功した報告がある^{4),13)~19)}。一般に、実際の運転で亜硝酸型の硝化反応を維持することは低濃度であるほど難しいと言われているが、CANON 法は、 $200\text{mgN}/\text{L}$ 以下程度の低濃度の含アンモニア排水に対しても安定した処理が行える可能性がある。我々は、前述のような大きなメリットを有する CANON 法に着目し、ベンチスケールの二重管型ガスリフトリアクターを用いて実験を行った。

Anammox 微生物は倍化時間が約 11 日と増殖速度が非常に遅い。十分量の Anammox 微生物をリアクター内に保持すること、かつ微生物が酸素による阻害を受けにくい状態にすることを目的に、種汚泥として事前に作成した Anammox グラニューールを用いた²⁰⁾。硝化菌の種汚泥には亜硝酸型の硝化処理を 1 年以上行い *Nitrosomonas* が含まれることを確認した硝化汚泥を用いた。

立上げ時の処理水濃度の変化および用いた種汚泥量とリアクターの処理能力との比較を行った。その後、リアクターの処理の安定性をみるため、一定条件での長期運転を行った。リアクター内に存在する微生物を存在形態によりグラニューールとフロックに分け、それぞれに含まれる微生物を複数の手法を用いて解析した。16S rDNA を用いた菌相解析を行い、リアクター内部に存在する微生物を調べた。また立上げ時からの微生物構成の変化を DGGE 法により解析した。菌相解析により確認されたアンモニア酸化菌と Anammox 微生物の存在量を RT-PCR 法によって解析し、存在割合の変化を調べた。

硝化菌の存在について、反応速度からの検討も行った。硝化速度の変化から、アンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌の存在量の変化について考察した。またフロックとして存在する汚泥の増加速度を測定し、リアクター全体の処理速度と照らし合わせてフロック汚泥の処理速度への寄与について考察した。

次に、CANON 法の処理に対する影響因子について検討を行った。CANON 法においては、流入する NH_4^+ をめぐってアンモニア酸化菌と Anammox 微生物が、生成した NO_2^- をめぐって亜硝酸酸化菌と Anammox 微生物が、酸素をめぐってアンモニア酸化菌と亜硝酸酸化菌が競合する。亜硝酸酸化菌が優占すると、処理水 NO_3^- 濃度の上昇、 NH_4^+ の残存が起こるため、窒素除去率が低下する。したがって、アンモニア酸化菌と Anammox 微生物の活性を保ち、亜硝酸酸化菌の働きを抑制する必要がある。

これらの微生物活性に影響を及ぼす因子としては、pH、温度、溶存酸素 (DO) 濃度、基質濃度 (NH_4^+ 、 NO_2^-)、水理的滞留時間 (HRT)、汚泥滞留時間 (SRT)、各種阻害物質濃度等が挙げられる。本実験ではその中で pH、温度、DO 濃度が Anammox グラニューールを活用する CANON 法の窒素除去性能に及ぼす影響について検討を行った。既報では、実際の実験条件として、pH は 7.8^{8,9)}、温度は 30°C^{8,9,11)} とされており、それ以外の条件での実験結果はない。DO 濃度は、SBR で 0~0.4mg/L⁸⁾、ガスリフトリアクターで 0.5mg/L¹⁰⁾、粒状微生物 (aggregates) を有する SBR では 0.16mg/L¹¹⁾ であった。他の条件についてはモデルを用いて検討されている²¹⁾。温度は 15~40°C の範囲で影響が検討され、DO 濃度については最適 DO 濃度は生物膜厚さ、アンモニア負荷、増殖速度、生物膜密度に依存することが示されている。DO 濃度が最適値から $\pm 0.2\text{mg/L}$ 違っても窒素除去率が 5~15% 低下するとし、アンモニア負荷に対応した DO 濃度制御が必須であると結論付けている。条件変化の影響はリアクター形状、特に微生物の存在形態によって異なるため、実際のリアクターにおける影響を調べることは重要である。本章の実験では、Anammox グラニューールとフロック汚泥が混在するエアリフトリアクターにおける条件変化の影響を示す。

第2節 実験方法

6-2-1 実験装置および材料

実験装置を Fig.6-1 に示す。容量 3.5L (反応部体積 2.7L)、外管内径 50mm、内管外径 32mm、内径 26mm の二重管型リアクターで、底部から空気を送ることによるガスリフト型となっている。合成基質、空気は共に底部から流入させ、処理水は上部の気固液分離部 (GSS) を経て処理水槽に排出される。DO 濃度および pH は GSS により分離された空気により液が流動する位置で測定した。リアクター温度はウォータージャケットにより調整した。pH は電磁定量ポンプ EH-B10VH-100PW1-PH1 (IWAKI) に pH ガラス電極 (METTLER TOLED) を接続し比例制御運転を行い、DO 濃度は pH メータ D-55 (HORIBA) を用いた隔膜式ガルバニ電池法で測定した。温度は Thermo Recorder おんどとり TR-71S 型 (T&D) で連続データを記録した。

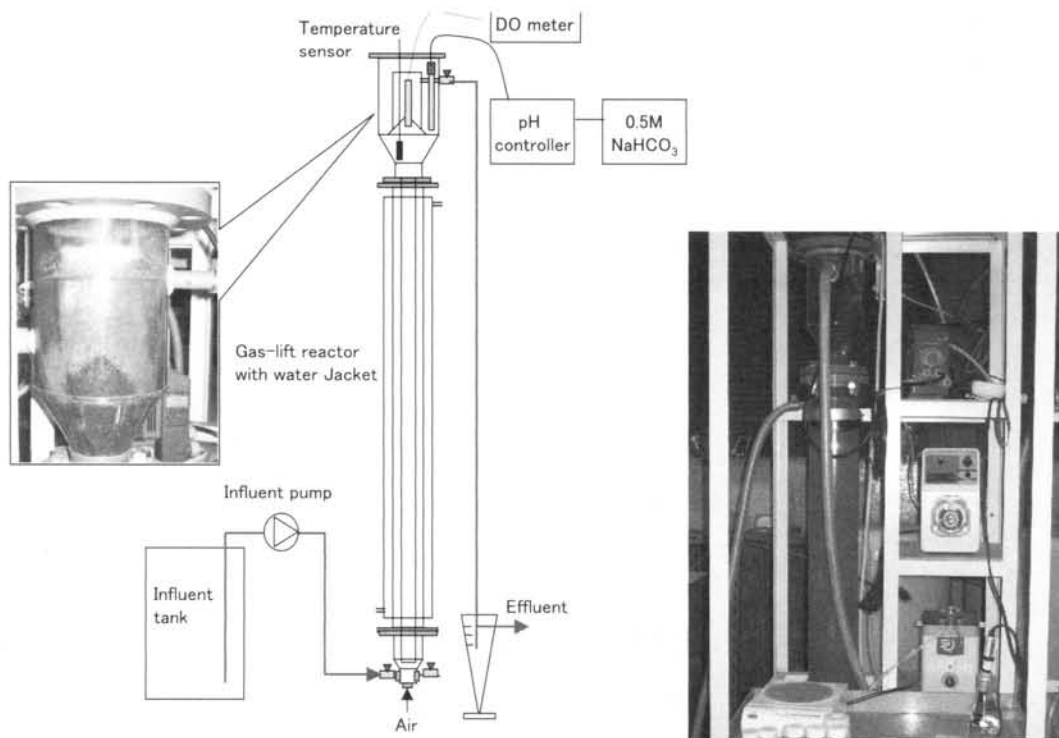


Fig. 6-1 Schematic diagram of gas-lift reactor system.

Anammox 微生物の種汚泥として、6ヶ月以上運転した上向流 Anammox リアクターから採取し、約2ヶ月間冷蔵保存した平均径 0.9mm の Anammox グラニュールを用いた。実験開始時に沈降体積 0.1L、5日目に 0.4L、合計 0.5L (28.17gSS (19.89gVSS)) のグラニュールを種汚泥として用いた。硝化菌の種汚泥には亜硝酸型の硝化を行う曝気槽から採取したフロック状汚泥 3.3gSS (3.0gVSS) を用いた。事前にグラニュールの Anammox 活性を回分実験により測定した。

基質には、窒素源として $\text{NH}_4\text{-N}$ のみを含む合成無機基質を用いた。基質の組成を Table 6-1 に示す。pH7.5 (0.5M の NaHCO_3 で調整)、温度 30°C の条件で連続実験を行った。

Table 6-1 Composition of synthetic medium

| | |
|---|-------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 472, 943 mg |
| KHCO_3 | 168 mg |
| KH_2PO_4 | 25 mg |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 300 mg |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 200 mg |
| Trace element I (EDTA 5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9.14 g/L) | 1ml |
| Tap water | 1L |

6-2-2 化学分析

定期的に NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- の濃度を HITACHI U-2010 を使い、 NH_4^+ は o-phenyl phenol を用いたインドフェノール青吸光度法の変法である OPP 法²²⁾、 NO_2^- は Colorimetric method²³⁾、 NO_3^- は Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method²³⁾ を用いて比色分析で測定した。SS、MLSS、MLVSS の分析は下水試験方法によった²⁴⁾。

6-2-3 立上げおよび長期運転

NH₄⁺濃度 100mgN/L の基質で運転を開始し、6 日目に基質濃度を 200mgN/L に変更した。その後は HRT を徐々に短くすることにより負荷を上げた。処理水中の NH₄⁺濃度が 10mgN/L 以下になった時を、負荷を上げるタイミングの目安とした。空気量は DO 濃度が約 0.2mg/L となるように調整した。

約 1 ヶ月の運転の後、用いた CANON グラニュール 12.79gMLSS (9.98gVSS) に硝化汚泥 0.80gMLSS (0.76gVSS) を添加して再度立上げを行い、基質 NH₄⁺濃度 200mgN/L、DO 濃度 0.5mg/L 以下で運転を行った。

6-2-4 環境因子の影響検討

DO 濃度を 0.8~2.0mg/L に上げて運転し、リアクタ内部に亜硝酸酸化菌が増殖した状態でリアクタ内の pH、温度、DO 濃度を変化させ、培養環境条件の変化が亜硝酸酸化菌の活性にどのような変化をもたらすかを調べた。実験条件を Table 6-2 に示す。pH、温度の値には、安定した亜硝酸化を長期間維持する目的で実験を行った過去の事例を参考に、亜硝酸が蓄積しやすいとされる条件を選択した²⁶⁾。

Table 6-2 Experimental conditions

| Run | pH | Temp(°C) | DO(mg/L) |
|-----|-----|----------|----------|
| I | 7.5 | 30 | 0.8~2.0 |
| II | 8.0 | 30 | 0.8~2.0 |
| III | 7.5 | 34.5 | 0.8~2.0 |
| IV | 7.5 | 30 | 0.2~0.4 |

6-2-5 微生物構成の解析

1) DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法による菌相解析

グラニュール 50μl をチューブに取り滅菌したスパテラを用いてグラニュールを破碎した。これから ISOPLAMT Kit を用いて染色体 DNA を抽出した。抽出した DNA は 100 μl の TE buffer に懸濁し、-20°C で保存した。抽出後、1%アガロースゲル電気泳動を行い DNA の抽出を確認した。

次に、抽出した DNA を希釈し細菌の 16S rDNA の PCR 増幅を行った。論文から、全細菌に特異的なバクテリアプライマーを選択した。357F+GC-Clamp と 534R は DGGE 用のバクテリアプライマーペアである。357F+GC-Clamp と 534R を組み合わせて PCR することで細菌の 16S rDNA の約 200 bp を増幅することができる。Table 6-3 に用いたプライマーを示す。

Table 6-3 Bacterial primer design

| Primer | Base sequence(5'-3') | | Tm | Position* |
|------------------------------|--------------------------------|---------|------|-----------|
| 357F+GC-Clamp ²⁵⁾ | CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCG | Forward | 87.8 | 357-374 |
| | CCGCCCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG | | | |
| 534R | ATTACCGCGGCTGCTGG | Reverse | 67.3 | 534-551 |

*: Escherichia coli 16S nucleotide numbering

サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 2400) を用い、各サンプル 2 本ずつ PCR を行った。PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 60°C 2sec, extension 68°C 40sec とし、28cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 1μl (約 3ng), primer 357F GC-Clamp 2μl (5pmol/μl), primer 534R 2μl (5pmol/μl), pre-mix 12μl, KOD -plus- 1μl (1 unit), 滅菌水 32μl, Total 50μl)。PCR 産物 5μl を 2%アガロースゲル電気泳動し、

PCR 増幅の確認をした。PCR 産物をエタノール沈殿し DNA の濃縮を行った。濃縮後 5 μ l の滅菌水に懸濁した。

THE DCODE™ UNIVERSAL MUTATION DETECTION SYSTEM (Bio RAD) 添付のフローチャートに従い、DGGE を行った。8%ポリアクリルアミドゲルで変性剤濃度 30%-50%(7M 尿素 40%ホルムアミドを 100%変性剤とした)、60°C の条件で 4 hr 泳動を行った。バンドパターンによる菌相解析の後、泳動ゲルのバンドから DNA を抽出しシーケンスを行った。NCBI BLAST プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて相同性検索を行なった。

2) クローニング+DGGE 法による菌相解析

実験に用いた試薬等を Table 6-4 に示す。

Table 6-4 Experimental materials and reagents for community analysis

| |
|---|
| ISOIL (Nippon Gene) |
| KOD -Plus- polymerase (Toyobo) |
| pre-mix (KOD buffer MgSO ₄ 1mM dNTP 0.2mM each) |
| pBluescript KS+ |
| Restriction enzyme(<i>Hinc</i> II M-buffer) (<i>Kpn</i> I <i>Sac</i> I L-buffer) |
| 1×TAE buffer (50×TAE buffer: Tris 242g/l, glacial acetic acid 57.1ml/l, 0.5M EDTA (pH 8.0) 100ml/l) |
| Ultra Clean DNA Purification system (Mo Bio) |
| DNA Ligation Kit Ver.2 solution I (Takara) |
| <i>E. coli</i> DH10B |
| X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) |
| IPTG (isopropyl- β -D-galactoside) |
| Solution I (glucose 50mM, Tris-HCl (pH 8.0) 25mM, EDTA (pH 8.0) 10mM) |
| Solution II (NaOH 0.2N, SDS 1%) |
| Solution III (5M potassium acetate 60ml, glacial acetic acid 11.5ml, sterilized water 28.5ml) |
| Chloroform isoamyl alcohol (chloroform 24ml, isoamyl alcohol 1ml) |
| TE buffer (Tris-HCl 1.21g/l, EDTA 0.37g/l) |
| LB+Amp plate (Polypepton 10g/l, Yeast extract 5g/l, NaCl 5g/l, Agar 15g/l, Ampicillin Sodium 0.1g/l) |
| LB+Amp medium solution (Polypepton 10g/l, Yeast extract 5g/l, NaCl 5g/l, Ampicillin Sodium 0.1g/l) |
| 100 % Denaturing Solution (7M Urea:(BIO-RAD: Electrophoresis Purity Reagent) 21.021g/50ml, 40% formamide: (BIO-RAD: Deionized) 20ml/50ml, sterilized water) |
| 10% Ammonium persulfate [(WAKO : for electrophoresis) : 0.1 g/1 ml sterilized water |
| 30% Acrylamide (acrylamide-HG (Wako) 29g/100 ml, N,N'-methylenebisacrylamide-HG (Wako) 1g/100 ml, sterilized water) |
| N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine |

ニッポンジーンの DNA 抽出キット ISOIL を使い、約 80 μ l の汚泥から DNA の抽出を行なった。抽出した染色体 DNA の濃度を分光光度計で測定し、10 ng/ μ l に希釈した。1 μ l を鋳型とし、バクテリアルプライマー-357F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') と 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') で PCR を行なった。PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 60°C 30sec, extension 68°C 15sec とし、30cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 1 μ l (10ng/ μ l) , primer 357F 2 μ l (5pmol/ μ l) , primer 534R 2 μ l (5pmol/ μ l) , pre-mix 12 μ l, KOD -plus- 1 μ l (1 unit) , 滅菌水 32 μ l, Total 50 μ l)。

増幅した DNA をプラスミドベクター (pBluescript KS+) を用いて大腸菌に形質転換を行なった。形質転換により得られたホワイトコロニーを選択後、LB+Amp 液体培地で一晩培養し、プラスミドを抽

出した。制限酵素 *Sac* I、*Kpn* I により消化し、アガロースゲル電気泳動でインサートの確認を行なった。

インサートを確認したクローンについて、DGGE 法を用いて分類を行なった。全菌体をターゲットとした primer 357F GC-clamp (5'-CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3) と 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3) を用いて PCR を行い、GC-clamp を付加した。PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 60°C 30sec, extension 68°C 15sec とし、30 cycles 行った (PCR 反応液組成: プラスミド DNA (50 倍希釈) 1µl, primer 357F+GC-clamp 1µl (10 pmol/µl), primer 534R 2µl (5pmol/µl), pre-mix 12µl, KOD -plus- polymerase 0.5µl (1unit), 滅菌水 33.5µl, total 50µl)。

増幅した DNA を DGGE 法で分類した。DGGE 法におけるゲルのポリアクリルアミド濃度は 6%、変成剤濃度勾配は 10-60% とし、60°C、泳動サンプル量各 5µl、150V で 135 分泳動を行った。泳動終了後、エチジウムブロマイド溶液にて染色を行い、Printgraph を用いて観察した。アクリルアミド変性ゲルの組成を Table 6-5 に示す。

Table 6-5 Composition of denaturing gradient gel

| Denaturing Solution concentration | 10% | 60% |
|-----------------------------------|---------|--|
| 30% Acrylamide solution | 4 ml | 4 ml |
| 50×TAE buffer | 0.4 ml | 0.4 ml |
| 100% Denaturing Solution | 4 ml | 12 ml |
| Sterilized water | 11.6 ml | 3.6 ml (Sterilized water 3.2 ml + Dye Solution 0.4 ml) |
| Total | 20 ml | 20 ml |

DGGE のバンドの位置でグループ分けを行ない、各グループから 1 クローンずつシーケンシングを行い、NCBI BLAST プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて相同性検索を行なった。

3) 改良 DGGE 法による菌相解析

上記 1) と 2) の実験結果が異なったため、最初に GC クランプの付いていないプライマーで PCR を行なった後に GC クランプを付加し、DGGE 法を用いて菌相解析を行なうこととした。実験に用いた試薬等を Table 6-6 に示す。

Table 6-6 Experimental materials and reagents for community analysis

| |
|--|
| ISOIL (Nippon Gene) |
| KOD -Plus- polymerase (Toyobo) |
| pre-mix (KOD buffer MgSO ₄ 1mM dNTP 0.2mM each) |
| TAE buffer |
| Ultra Clean DNA Purification system (Mo Bio) |
| 100% Denaturing Solution |
| 10% Ammonium persulfate |
| 30% Acrylamide |
| N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine |
| SYBR Gold nucleic acid gel stain |

ISOIL を用いて抽出した染色体 DNA 10 ng を鋳型として、プライマー 357F と 534R で PCR を行い、

16S rDNA を増幅した。PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 60°C 30sec, extension 68°C 30sec とし、27cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 1 μ l (10 ng/ μ l) , primer 357F 2 μ l (5pmol/ μ l) , primer 534R 2 μ l (5pmol/ μ l) , pre-mix 12 μ l, KOD -plus- 1 μ l (1unit) , 滅菌水 32 μ l, Total 50 μ l)。

PCR 産物中のプライマーを除くため、PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、DNA のバンドを切り出し、ゲル抽出を行なった。その後、再度 2%アガロースゲルで電気泳動し、DNA の濃度確認を行なった。濃度確認した PCR 産物 30 ng を鋳型として、357F+GC-Clamp と 534R で PCR を行ない、GC クランプを付加した。PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 60°C 30sec, extension 68°C 30sec とし、9cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 2 μ l (30 ng) , primer 357F+GC-Clamp 0.5 μ l (10pmol/ μ l) , primer 534R 1 μ l (5pmol/ μ l) , pre-mix 12 μ l, KOD -plus- 0.5 μ l (0.5 unit) , 滅菌水 34 μ l, Total 50 μ l)。

GC クランプを付加した PCR 産物をエタノール沈殿で濃縮した。分光光度計を用いて得られた DNA 溶液の濃度測定を行った。全サンプル 2000 ng となるようにし、泳動サンプルとした。

THE DCODE™ UNIVERSAL MUTATION DETECTION SYSTEM (BIO-RAD) を用いて DGGE を行なった。DGGE 法におけるゲルのポリアクリルアミド濃度は 8%、変成剤濃度勾配は 30-60%とし、100V で 16hr 泳動を行った。ゲルの組成を Table 6-7 に示す。泳動終了後、SYBR Gold nucleic acid gel stain にて染色を行い、Printgraph およびフルオロ・イメージアナライザーで観察した。

Table 6-7 Composition of denaturing gradient gel

| Denaturing Solution concentration | 30% | 60% |
|-----------------------------------|---------|--------|
| 30% Acrylamide solution | 8 ml | 8 ml |
| 50×TAE buffer | 0.6 ml | 0.6 ml |
| 100% Denaturing Solution | 9 ml | 18 ml |
| Sterilized water | 12.4 ml | 3.4 ml |
| Total | 30 ml | 30 ml |

6-2-6 アンモニア酸化菌・Anammox 菌の存在割合の解析

Anammox 菌、硝化菌の割合を定量するため、リアルタイム PCR (RT-PCR) 法による解析を行った。実験に用いたプライマーおよび試薬を Table 6-8 に示す。

Table 6-8 Primers and experimental reagents for RT-PCR

| |
|---|
| primer fluorescent 16S6F |
| Primer fluorescent RT1R |
| Primer fluorescent Ana-5' |
| primer 16S6F (5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3') |
| primer EUB338 I (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') |
| primer EUB338 II (5'-GCAGCCACCCGTAGGTGT-3') |
| primer RT1R (5'-CGTCCTCTCAGACCARCTACTG-3') |
| primer CTO189fC (5'-GGAGGAAAGTAGGGGATCG-3') |
| primer CTO189fM (5'-GGAGRAAAGCAGGGGATCG-3') |
| primer Ana-3' (5'-TAGAGGGGTTTTGATTAT-3') |
| primer Ana-5' (5'-GGACTGGATACCGATCGT-3') |
| KOD -Plus- polymerase (Toyobo) |
| pre-mix (10×buffer MgSO ₄ 1mM dNTP 0.2mM each) |
| QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) |

グラニューール 265day (2005/1/13) より抽出した染色体 DNA を鋳型として検量線を作成した。

最初に primer EUB338 I and II と primer 16S-6F を用い全菌体の検量線 PCR を行った。PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 60°C 30sec, extension 68°C 30sec とし、30cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 1 μ l (10ng/ μ l) , 16S6F 2 μ l (5pmol/ μ l) , EUB338 I and II 2 μ l (各 5 pmol/ μ l) , pre-mix 12 μ l, KOD -plus- 1 μ l (1 unit) , 滅菌水 32 μ l, Total 50 μ l)。次に primer Ana-3' と primer Ana-5' を用い Anammox 菌の検量線 PCR を行った。PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 50°C 30sec, extension 68°C 30sec とし、30cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 1 μ l (10ng/ μ l) , Ana-3' 2 μ l (5pmol/ μ l) , Ana-5' 2 μ l (5pmol/ μ l) , pre-mix 12 μ l, KOD -plus- 1 μ l (1 unit) , 滅菌水 32 μ l, Total 50 μ l)。次に primer CTO189fMC と primer RT1R を用い硝化菌の検量線 PCR を行った。PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 60°C 30sec, extension 68°C 30sec とし、30cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 1 μ l (10ng/ μ l) , CTO189fMC 2 μ l (各 5pmol/ μ l) , RT1R 1 μ l (5pmol/ μ l) , pre-mix 12 μ l, KOD -plus- 1 μ l (1 unit) , 滅菌水 33 μ l, Total 50 μ l)。

全ての PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製し、スペクトロフォトメーターを用いて濃度測定を行い、DNA 濃度が 1 pg/ μ l、0.1 pg/ μ l、0.01 pg/ μ l、0.001 pg/ μ l となるように希釈した。

希釈した検量線の DNA をそれぞれ 10 μ l と、抽出した染色体 DNA を 1 ng/ μ l に希釈したサンプル 10 μ l を用いて RT-PCR を行い、消光サイクルの測定をした。全菌体の RT-PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 60°C 30sec, extension 68°C 30sec とし、40cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 10 μ l, 蛍光 16S6F 1 μ l (10pmol/ μ l) , EUB338 I and II 2 μ l (各 5pmol/ μ l) , pre-mix 12 μ l, KOD -plus- 1 μ l (1 unit) , 滅菌水 24 μ l, Total 50 μ l)。Anammox 菌の RT-PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 50°C 30sec, extension 68°C 30sec とし、40cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 10 μ l, 蛍光 Ana-5' 1 μ l (10pmol/ μ l) , Ana-3' 2 μ l (5pmol/ μ l) , pre-mix 12 μ l, KOD -plus- 1 μ l (1 unit) , 滅菌水 24 μ l, Total 50 μ l)。硝化菌の RT-PCR 条件は、denaturing 94°C 15 sec, annealing 60°C 30sec, extension 68°C 30sec とし、40cycles 行った (PCR 反応液組成: DNA 10 μ l, 蛍光 RT1R 1 μ l (10pmol/ μ l) , CTO189fMC 1 μ l (各 10pmol/ μ l) , pre-mix 12 μ l, KOD -plus- 1 μ l (1 unit) , 滅菌水 25 μ l, Total 50 μ l)。

6-2-7 グラニューールとフロックの硝化速度測定

回分実験により硝化速度を測定した。リアクターから汚泥を全量取り出し、1mm のメッシュを用いてフロック (<1mm) とグラニューール (>1mm) を分離した。フロックのみを有効体積 1L のリアクタに入れ、pH 7.5、温度 30°C で硝化速度の測定を行った²⁴⁾。その間、常時エアープンプで曝気を行い DO 濃度を維持した。同様に、グラニューールでも硝化速度の測定を行った。培地には Table 6-1 に示した基質に窒素源として NH₄⁺ 約 75mgN/L を添加したものをを用い、実験終了後に MLSS 濃度、MLVSS 濃度を測定し、汚泥当たりの硝化速度を算出した。

6-2-8 フロック汚泥増加速度の測定

上記と同様にリアクターの汚泥全量をグラニューールとフロックとに分離し、グラニューールのみをリアクターに戻した。その後、週に 2 回汚泥全量を回収し、1mm メッシュと 0.5mm メッシュを用いて汚泥をグラニューール (>1mm)、グラニューールから剥離したバイオフィーム (0.5~1.0mm)、汚泥フロック (<0.5mm) の 3 種類に分類してそれぞれ量を測定した。グラニューールは 1L のメスシリンダーに入れ、30 分放置して沈降体積を測定した。フロックについては SS 濃度を、バイオフィームについては MLSS 濃度と MLVSS 濃度を測定した。測定用のサンプル以外のものは全てリアクタに戻した。

第 3 節 実験結果および考察

6-3-1 立上げ時の処理速度変化

立上げ後 33 日間の基質濃度、処理水濃度、HRT の経時変化を Fig.6-2 に、窒素負荷と Anammox 速度、アンモニア酸化速度、亜硝酸酸化速度の経時変化を Fig.6-3 に示す。窒素の減少は Anammox 反応のみによると仮定し、Anammox 速度は全窒素の減少量から算出した。アンモニア酸化速度および亜硝酸酸化速度は流入・流出水の濃度の値と式(6-2)の Anammox の化学量論式を用いて、下式により算出した値を示している。亜硝酸酸化速度は式(6-10)によっても算出し、式(6-9)との差が 1.6mgN/L 以下であることを確認した。

$$\text{流入全窒素} - \text{流出全窒素} = \Delta \text{TN} \quad (6-4)$$

$$\Delta \text{NH}_{4\text{ANA}} = \Delta \text{TN} \times 1 / (1.02 \times 2) \quad (6-5)$$

$$\Delta \text{NO}_{2\text{ANA}} = \Delta \text{TN} \times 1.32 / (1.02 \times 2) \quad (6-6)$$

$$\text{NO}_{3\text{generation ANA}} = \Delta \text{TN} \times 0.26 / (1.02 \times 2) \quad (6-7)$$

$$\text{亜硝酸化} (\Delta \text{NH}_{4\text{Nit}}) = (\text{NH}_{4\text{inf}} - \text{NH}_{4\text{eff}}) - \Delta \text{NH}_{4\text{ANA}} \quad (6-8)$$

$$\text{硝酸化} (\Delta \text{NO}_{2\text{Nit}}) = (\text{NO}_{2\text{inf}} - \text{NO}_{2\text{eff}}) + \Delta \text{NH}_{4\text{Nit}} - \Delta \text{NO}_{2\text{ANA}} \quad (6-9)$$

$$\text{硝酸化} (\Delta \text{NO}_{2\text{Nit}}) = (\text{NO}_{3\text{eff}} - \text{NO}_{3\text{inf}}) - \text{NO}_{3\text{generation ANA}} \quad (6-10)$$

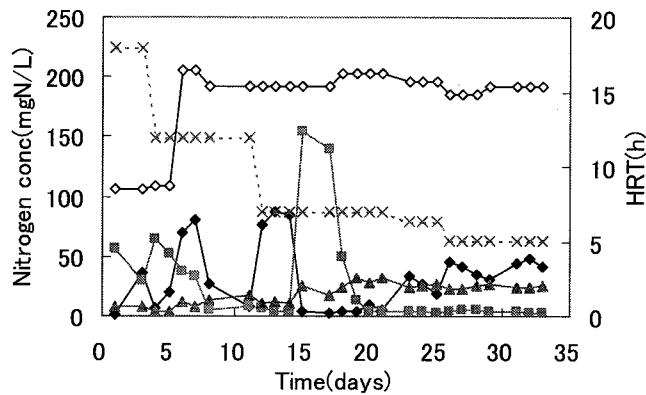


Fig. 6-2 Changes in HRT and nitrogen concentration; Symbols ◇:NH₄-N inf, ◆:NH₄-N eff, ■:NO₂-N eff, ▲:NO₃-N eff, ×:HRT

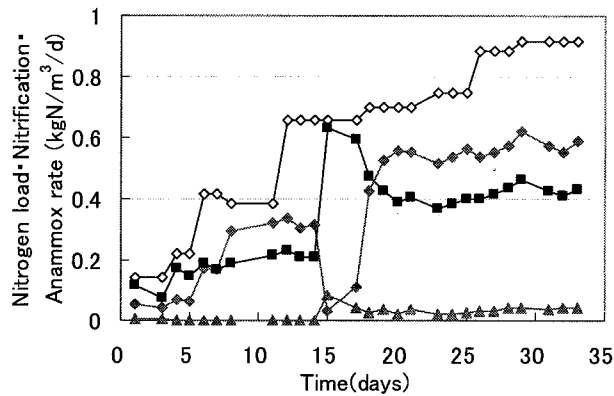


Fig.6-3 Changes in nitrogen loading rates and reaction rates of anammox, nitritation (oxidation of ammonium to nitrite) and nitratation (oxidation of nitrite to nitrate); Symbols ◇:Nitrogen load, ◆:Anammox, ■:NH₄-N →NO₂-N, ▲:NO₂-N→NO₃-N

種汚泥として添加した Anammox グラニューールの VSS 当たりの Anammox 反応速度は 0.1kgN/kgVSS/d であり、初期添加量は最大窒素除去速度 $0.20\text{kgN/m}^3/\text{d}$ の能力を有していると計算された。しかし、処理水濃度から計算した Anammox 速度は $0.05\text{kgN/m}^3/\text{d}$ と低かった。これは微好気条件におかれた Anammox 微生物が酸素による阻害を受けたためであると推察される。しかし活性が完全に失われていないことから、一部の嫌気条件は確保されていることがわかる。アンモニア酸化速度は $0.11\text{kgN/m}^3/\text{d}$ の速度を有したため、処理水中に NO_2 が残存した。そこで、5 日目に Anammox グラニューールを追加投入した。

アンモニア酸化速度は 4 日目から 14 日目まで約 1.2 倍の増加であるのに対し、Anammox 速度は 6 日目以降 3 日間で、5 日目の値の 4.6 倍に上昇した。処理水中の NO_2 は 5 日目から低下傾向がみられたが、これはアンモニア酸化速度の低下が原因であり、6 日目以降の低下は Anammox 速度の上昇に従うものであると考えられる。

12 日目以降の負荷上昇時には NO_2 濃度は 10mgN/L 以下で推移し上昇はみられなかった。Anammox 反応速度の上昇により、硝化反応で生じた NO_2 は Anammox 反応により即座に窒素ガスへ変換されたためと考えられる。20 日目以降は処理水中に NH_4^+ が残存し、負荷を上げるとその濃度も上昇した。処理水中の NO_3 濃度は Anammox 速度の上昇に伴い高くなった。

リアクター内 DO 濃度、アンモニア酸化菌によるアンモニア消費速度、Anammox によるアンモニア消費速度の経時変化を Fig.6-4 に示す。DO 濃度が 0.23mg/L から 0.90mg/L に上昇した 15 日目に、アンモニア酸化速度は前日の 3 倍の値に大きく上昇し、逆に Anammox 反応速度は 10 分の 1 の値に低下した。その後 DO 濃度を 0.8mg/L (18 日目) とすると Anammox 速度は $0.21\text{kgNH}_4\text{-N/m}^3/\text{d}$ まで上昇し、DO 濃度 0.6mg/L (19 日目) においては $0.26\text{kgNH}_4\text{-N/m}^3/\text{d}$ となった。アンモニア酸化速度は 19 日目以降約 $0.4\text{kgNH}_4\text{-N/m}^3/\text{d}$ に低下し、その後大きな変動はなかった。

この結果より、本リアクターに存在する Anammox 微生物は DO 濃度の上昇 (0.9mg/L 以上) により阻害を受け、阻害は DO 濃度を下げることで (0.6mg/L 以下) により回復することが示された。Anammox 微生物は酸素に対する阻害の感度が強く、酸素分圧 0.5% でも阻害を受けるとされているが、本実験で用いた Anammox 微生物はグラニューールの形態で存在するため、グラニューールの外側に酸素を消費する層が形成され、内部に嫌気ゾーンが確保されたと推測される²⁶⁾。

また、リアクターのアンモニア酸化活性は $0.6\text{kgNH}_4\text{-N/m}^3/\text{d}$ 以上の速度を有していたが、その後 0.3mg/L 以下の低 DO 運転によりその活性の抑えられていることが確認された。

Fig.6-3 から明らかなように、DO 濃度が高かった期間の後、亜硝酸酸化速度の上昇することがわかる。低 DO 運転に戻した後も、硝化速度は約 $0.04\text{kgN/m}^3/\text{d}$ で推移した。これは高 DO 時に亜硝酸酸化菌が増殖したためと考えられる。その後の低 DO 運転により亜硝酸酸化速度の上昇は抑えられるものの、亜硝酸酸化菌は系内に何らかの形で留まり、その反応を完全には抑えられないことが示された。

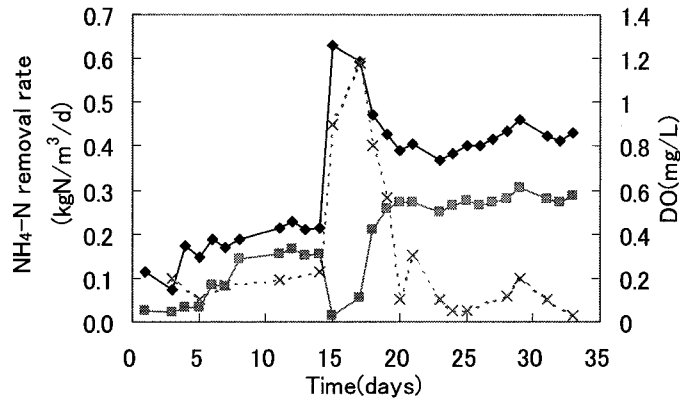


Fig. 6-4 Changes in ammonium removal rate by nitrification, ammonium removal rate by anammox reaction and DO concentration; Symbols ◆:Nitrification, ■:Anammox, ×:DO

窒素負荷と得られた最大窒素除去速度および除去率、その時の処理水窒素濃度を Table 6-9 に示した。Anammox による窒素除去速度の 33 日間の最大値は $0.62\text{kgN/m}^3/\text{d}$ であった。種汚泥として添加した Anammox グラニューールの VSS 当たりの Anammox 反応速度は 0.1kgN/kgVSS/d であり、使用したグラニューールの全量は窒素除去速度 $1.14\text{kgN/m}^3/\text{d}$ の能力を有していた。したがって、Anammox グラニューールとアンモニア酸化菌を用いて立ち上げたガスリフト CANON リアクターは、約 1 ヶ月間の立上げ運転により、添加 Anammox グラニューールの窒素除去能力に対し 56%の能力を持つことが確認された。また、窒素除去率の最大値は 79.9%であり、負荷の調整によって処理水の NH_4^+ 、 NO_2^- を 10mgN/L 以下にした高除去率運転が可能なることも示された。

Table 6-9 Treatment results of CANON reactor under various operational conditions

| day | Influent conc. (mgN/L) | Load (kgN/m ³ /d) | Max. N-removal | | Effluent concentration | | |
|-------|------------------------|------------------------------|-------------------------|------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | (kgN/m ³ /d) | (%) | NH ₄ (mgN/L) | NO ₂ (mgN/L) | NO ₃ (mgN/L) |
| 1-3 | 100 | 0.14 | 0.05 | 37.4 | 1.2 | 57.0 | 8.5 |
| 4-5 | 100 | 0.22 | 0.07 | 31.2 | 7.2 | 64.6 | 3.5 |
| 6-11 | 200 | 0.40 | 0.32 | 79.6 | 8.0 | 8.5 | 17.0 |
| 12-17 | 200 | 0.66 | 0.34 | 51.2 | 77.0 | 6.2 | 10.5 |
| 18-21 | 200 | 0.70 | 0.56 | 79.9 | 9.5 | 3.5 | 28.0 |
| 22-25 | 200 | 0.75 | 0.56 | 75.3 | 18.5 | 3.0 | 27.0 |
| 26-33 | 200 | 0.90 | 0.62 | 68.9 | 31.0 | 3.7 | 27.0 |

6-3-2 低 DO 濃度域での長期運転結果

上記実験で用いた CANON グラニューールと硝化汚泥を用いて再度立上げを行い、 0.5mg/L 以下の DO 条件での処理の安定性を検討した。Fig.6-5、Fig.6-6 に処理結果を示す。各反応速度の値は式(6-4)~(6-9)によって算出した。式(6-9)と式(6-10)との差は 2.4mgN/L 以下であった。約 4 ヶ月の運転中、硝酸化は抑えられ Anammox 活性が保たれた。グラフ中硝酸化速度が上がっているところは、トラブルにより一時的に DO が 0.8mg/L 以上に上昇したことによるものである。処理水には NO_2^- の蓄積はみられなかった。一時的に NH_4^+ が上昇した点はトラブルによる空気量の一時的な低下 (45~47day)、pH の低下 (54day) が原因である。96day に空気量を増やしたところ NH_4^+ 濃度が低下したことから、57~94day については空気量の不足が原因であると推察される。リアクター能力に対し低い負荷とし、空気量を

調節することにより、 NH_4^+ 、 NO_2^- を残存させず、 NO_3^- の生成を Anammox によるもののみとして、高除去率を得る運転が可能であることが確認できた。消費された NH_4^+ に対する生成 NO_3^- のモル比 ($\text{NO}_3\text{-N}/\text{NH}_4\text{-N}$) は、一時的に硝酸化が起こった3点 (13、28、54day) を除くと 0.06~0.26 (平均 0.13) であった。実験期間中の最大窒素除去率は 87.4%、平均窒素除去率は 74.0% であり、部分亜硝酸化と Anammox 反応を約 4 ヶ月間継続させることができた。

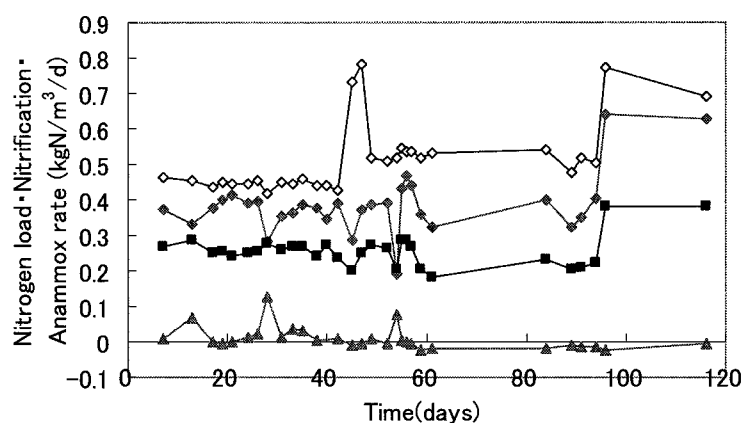


Fig. 6-5 Changes in nitrogen load and reaction rate of anammox, nitritation and nitratation under low DO condition; Symbols \diamond :Nitrogen load, \blacklozenge :Anammox, \blacksquare : $\text{NH}_4\text{-N} \rightarrow \text{NO}_2\text{-N}$, \blacktriangle : $\text{NO}_2\text{-N} \rightarrow \text{NO}_3\text{-N}$

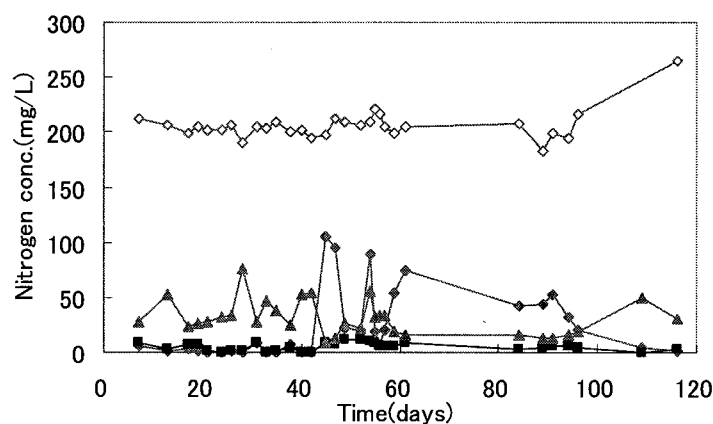


Fig. 6-6 Changes in influent and effluent nitrogen concentration under low DO condition; Symbols \diamond : $\text{NH}_4\text{-N}$ inf, \blacklozenge : $\text{NH}_4\text{-N}$ eff, \blacksquare : $\text{NO}_2\text{-N}$ eff, \blacktriangle : $\text{NO}_3\text{-N}$ eff

6-3-3 pH、温度、DO 濃度の影響

Fig.6-7 に pH、温度、DO 濃度を変化させたときの反応速度の経日変化を示した。各反応速度の値は式(6-4)~(6-9)によって算出した。式(6-9)と式(6-10)との差は 1.3mgN/L 以下であった。図中番号は Table 6-2 における条件を示す。始めに DO 濃度を 0.2mg/L から 0.8~2.0mg/L に上げ(Run I)、硝酸化速度を上昇させた。pH を 7.5 から 8.0 に変化させたところ(Run II)、硝酸化の抑制はみられず、Anammox 速度は低下した。次に温度を 30℃から 35℃に上げたところ(Run III)、Anammox 速度の上昇は見られたが、硝酸化速度も上昇しており、窒素除去率はほとんど変わらなかった。次に DO 濃度を 0.8~2.0mg/L から 0.2~0.4mg/L に下げたところ(条件IV)、亜硝酸化速度および硝酸化速度が低下傾向を示し、Anammox

速度は逆に上昇した。その結果、除去率の向上がみられた。Table 6-10 に運転条件の処理特性に及ぼす影響を示した。

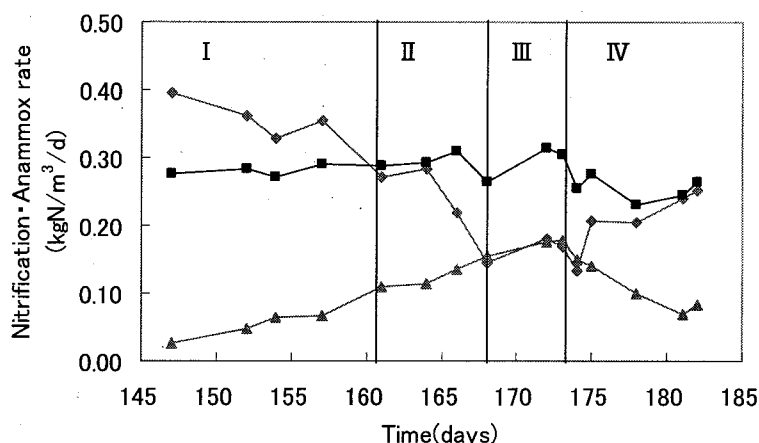


Fig. 6-7 Changes in reaction rate of anammox, nitritation and nitratation at each condition, I (pH 7.5, 30°C, DO 0.8-2.0mg/L), II (pH 8.0, 30°C, DO 0.8-2.0mg/L), III (pH 7.5, 34.5°C, DO 0.8-2.0mg/L), IV (pH 7.5, 30°C, DO 0.2-0.4mg/L); Symbols ◆:Anammox, ■:NH₄-N→NO₂-N, ▲:NO₂-N→NO₃-N

Table 6-10 Effect of operational conditions on treatment performances

| Run | pH | Temp(°C) | DO(mg/L) | Nitritation | Anammox | Nitratation | N-removal |
|-----|-----|----------|----------|-------------|---------|-------------|-----------|
| I | 7.5 | 30 | 0.8~2.0 | △ | × | ○ | × |
| II | 8.0 | 30 | 0.8~2.0 | × | × | ○ | × |
| III | 7.5 | 34.5 | 0.8~2.0 | ○ | ○ | ○ | △ |
| IV | 7.5 | 30 | 0.2~0.4 | × | ○ | × | ◎ |

Symbols ◎:very effective, ○:effective, △:No effect, ×:negative effect

連続実験における DO 濃度の値の変化が Anammox・亜硝酸化・硝酸化の各速度に与える影響を、30°C と 35°C において詳細に検討した。結果を Fig.6-8 に示す。DO 濃度の低下とともに亜硝酸化速度、硝酸化速度が低下する傾向がみられた。Anammox 速度は 30°C、35°C とともに DO 濃度 0.3mg/L 付近で最大となった。DO 濃度 0.2mg/L 以下において Anammox 速度が低下したのは、亜硝酸化速度の低下により、基質である亜硝酸の生成が減少したためであると推察される。既報のモデルを用いた解析では、負荷量 2gNH₄-N/m²/d、生物膜厚さ 0.7mm の条件で最大除去率を得る DO 濃度は、30°C で 0.8mg/L (除去率 74%)、35°C で 0.9mg/L (85%) である²¹⁾。同じ負荷では温度が低いほど最大除去率を得るのに大きな生物膜厚さと高い DO 濃度が必要であり、2gNH₄-N/m²/d において、それぞれ 30°C では 1mm、1.3mg/L、35°C では 0.6mm、0.8mg/L となっている。本リアクターにおいては、生物の存在形態は径約 1mm のグラニューールとブロック汚泥の混在であるため、生物膜面積当たりの負荷を用いたモデルと比較することは困難であるが、生物膜厚さをブロック径の半分の 0.5mm と仮定すれば、30°C における至適 DO 濃度は 0.5mg/L、35°C では 0.6mg/L であり、本実験の結果に近い値となる。本実験における Anammox の至適 DO 濃度が 0.3mg/L であったのは、ブロック汚泥中の硝化菌も反応に寄与するため、全ての硝化菌が生物膜表面に存在する場合と比較すると生物膜の硝化菌が少なく、より低い DO 濃度で Anammox に対する阻害が起こるためであると考えられる。また、計算では競合に負けるはずの亜硝酸酸化菌が、

一度系内に増殖すると反応速度は低下しても完全に消失することはなく、その存在を考慮した制御が必要であることが示された。

CANON リアクター内のアンモニア酸化菌、Anammox 微生物の活性を保ちつつ亜硝酸酸化菌の活性を抑制するためには、極端な環境条件を用いることはできず、3 者の至適条件の僅かな差を利用することが必要である。上記の結果から、本実験で検討した pH、温度と比較し、DO 濃度の値がこの競合状態により大きく影響を与えることが確認された。CANON 法においては、硝酸化速度の上昇は窒素除去率の低下を引き起こすため、NO₃-N の生成を抑制する必要がある。DO 濃度の制限が硝酸化抑制に最も効果的であると考えられる。ただし、DO 濃度が 0.2mg/L 以下では酸素律速となるために亜硝酸化速度が下がり、その結果として Anammox 速度が下がる。したがって、硝酸化を抑制し、かつ高い窒素除去速度を保つためには、DO 濃度を 0.2~0.5mg/L で運転することが望ましいと言える。

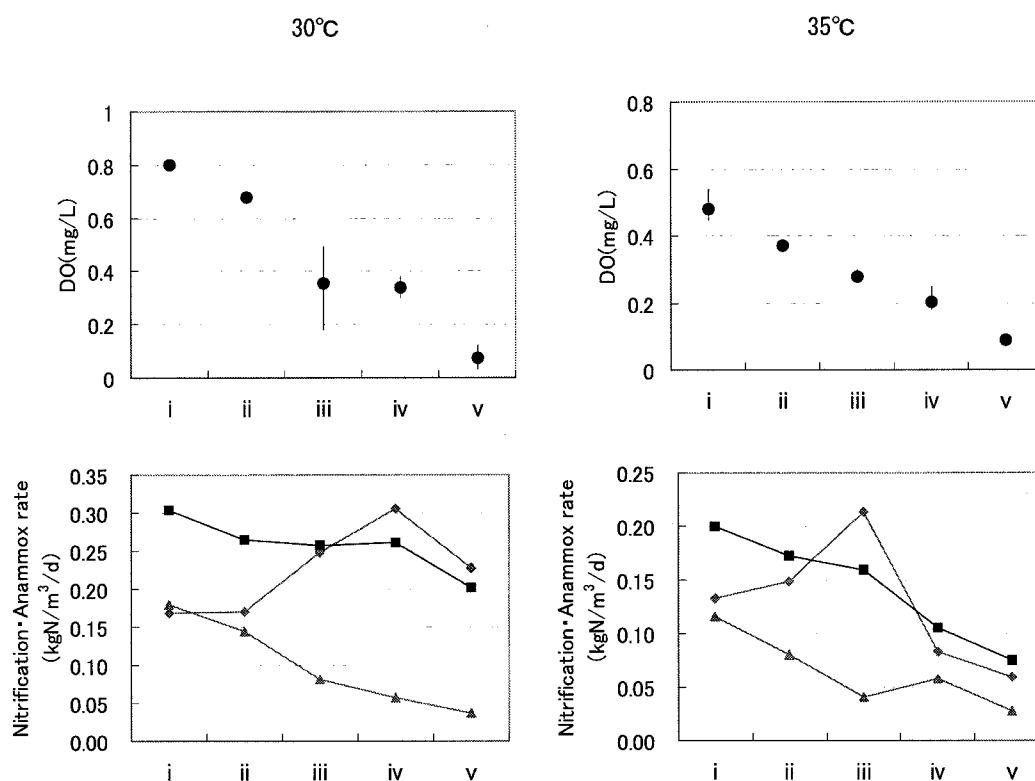


Fig. 6-8 Effect of DO concentration on each reaction rate (left: 30°C, right: 35°C); Symbols ●:DO(average), ◆:Anammox, ■:NH₄-N→NO₂-N, ▲:NO₂-N→NO₃-N

6-3-4 CANON リアクター内の微生物構成

1) DGGE 法による菌相解析結果

CANON リアクターから経時的に採取したグラニューール 13day (2004/5/6)、グラニューール 63day (2004/6/25)、グラニューール 103day (2004/8/4)、フロック 63day (2004/6/25)、種汚泥として用いたものと同じ Anammox グラニューール (2004/8/4) を対象に解析を行った。

ISOPLANT Kit を用いて抽出した DNA を 1%アガロースゲル電気泳動を行ない、10kb より大きい位置に鮮明なバンドを確認した。以後の実験では、この抽出した染色体 DNA をサンプルとして用いた。

抽出した DNA をバクテリアプライマー-357F+GC-clamp と 534R を用いて PCR による 16S rDNA の

増幅を行い、2%アガロースゲル電気泳動を行ったところ、目的とする約200bpの鮮明なバンドが得られた。

細菌の分類をDGGEで行うため357F+GC-Clampと534RでPCRした。PCR産物を8%ポリアクリルアミドゲル、変性剤濃度30%-50%、60°Cの条件で4hr泳動を行った結果をFig.6-9に示す。

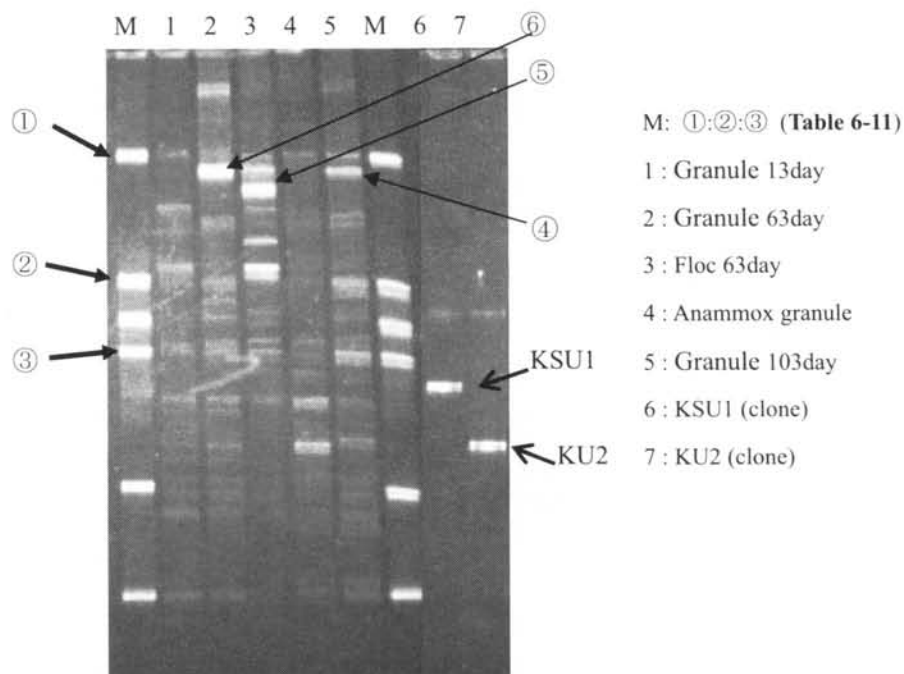


Fig.6-9 DGGE patterns of granule and floc samples

DGGEを行った結果、各グラニューール、フロックは異なるバンドパターンを示し、異なる菌相であることが分かった。また、既知のAnammox微生物であるKSU1、KU2のクローンを泳動した結果、AnammoxグラニューールにはKU2が存在していることが分かった(lane 4)。他のサンプルを見ると、グラニューール13day、63day、103dayにKU2と思われるバンドが見られ、フロック63dayには見られなかった。Table 6-11に、グラニューール103dayより得られたclone(図中①、②、③)と、泳動ゲルのバンド(図中④、⑤、⑥)からDNAを抽出しシーケンスを行ったものと相同性の高い細菌を示す。

グラニューール63dayには、種汚泥であるAnammoxグラニューールとグラニューール13dayには見られなかった*Nitrosomonas europaea*と相同性を示す細菌が主要であった。グラニューール103dayには、*Nitrosomonas europaea*のバンドは63dayと比較すると薄くなったが全体のパターンから見ると主要な存在であり、Uncultured yard-trimming-compost bacterium clone S-57、Uncultured Bacteroidetes bacterium clone BJiii32と相同性を示す細菌が存在した。また、KU2の存在も分かった。グラニューールの経時変化を見ると、*Nitrosomonas europaea*が一時的に増加した後、主要な細菌数が増加しているように思われる。フロック63dayは*Nitrosomonas europaea*と思われるバンドが見られたが、最も濃いバンドは*Psychrobacter sp*と相同性を示す細菌であった。KU2のバンドは見られなかった。

Table 6-11 Highly-homologous bacteria

| | Bacterial name | Homology (%) |
|-----|--|--------------|
| ① | Uncultured eubacterium partial (AJ412669.1) | 99 |
| | Uncultured bacterium clone 1-2 (AY548931.1) | 99 |
| ② | Uncultured yard-trimming-compost bacterium clone S-57 (AY095422.1) | 93 |
| | Uncultured Lake Michigan sediment bacterium LMBA1 (AF320931.1) | 95 |
| ③ | Uncultured Bacteroidetes bacterium clone BJjiii32 (AJ318154.1) | 94 |
| | Uncultured bacterium MK22 (AF087075.1) | 93 |
| ④・⑥ | <i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718 (BX321856.1) | 98 |
| ⑤ | <i>Psychrobacter</i> sp. (AY437611.1) | 100 |

2) クローニング+DGGE 法による菌相解析結果

CANON グラニュール 13day (2004/5/6) を対象として、解析を行った。DNA 抽出キット ISOIL を用いて染色体 DNA を抽出した結果、アガロースゲル電気泳動により鮮明な染色体 DNA のバンドを確認することができた。形質転換したクローンの PCR 産物の増幅 DNA を確認した後、DGGE バンドパターンを調べた。結果を Fig.6-10 に示す。⑩はインサートがなかったのを省いた。DGGE のバンドパターンによりクローンを Table 6-12 に示すように 10 グループに分類した。各パターンの代表サンプル(下線付きの番号) についてシーケンシングを行なった結果を Table 6-13 に示す。

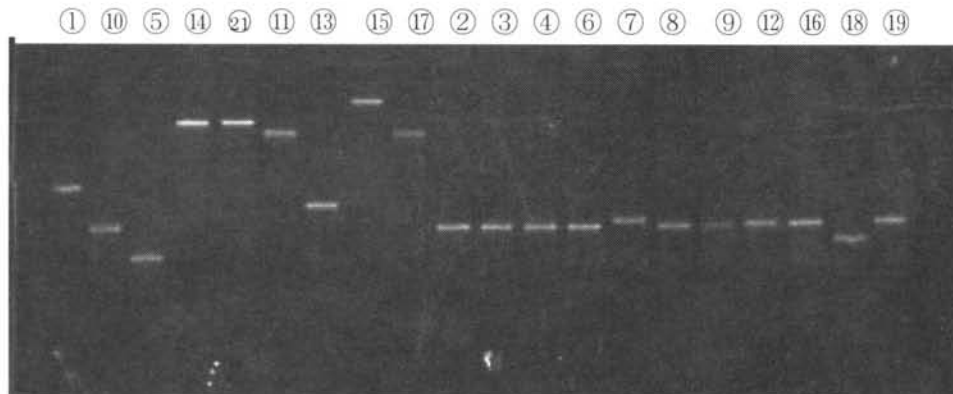


Fig.6-10 DGGE patterns of 20 clones

Table 6-12 Classification of clones

| Group | Number of clone |
|-------|----------------------|
| A | <u>①</u> |
| B | <u>②</u> ③④⑥⑧⑨⑫⑬⑮⑰⑱⑳ |
| C | <u>⑤</u> |
| D | <u>⑦</u> |
| E | <u>⑩</u> |
| F | <u>⑪</u> ⑭ |
| G | <u>⑬</u> |
| H | <u>⑭</u> ⑲ |
| I | <u>⑮</u> |
| J | <u>⑱</u> |

Table 6-13 Results of BLAST search

| Group | Highly-homologous bacteria | Homology |
|-------|--|----------------|
| A | Uncultured bacterium clone DSBR-B050 (AY302125.1) Uncultured bacterium clone DSBR-B022 (AY302120.1) | 100% (155/155) |
| B | Uncultured planctomycete clone PLA16 (AY167666.1) Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete KOLL2a (AJ250882.1) Uncultured anoxic sludge bacterium KU2 (AB054007.1) | 100% (161/161) |
| C | Uncultured Chloroflexi bacterium clone AKYH973 (AY921926.1) | 98% (135/137) |
| | Uncultured Chloroflexi bacterium clone AKYH1397 (AY921879.1) | 96% (131/136) |
| D | Uncultured bacterium clone Lgia-55 (AY381283.1) Uncultured bacterium clone PL-32B9 (AY570618.1) | 92% (141/153) |
| E | Rhodobacter gluconicum gene (AB077986.1) Uncultured sludge bacterium A15b (AF234740.1) | 100% (135/135) |
| F | Uncultured bacterium clone K4_33 (AY793665.1) Uncultured bacterium PHOS-HE36 (AF314435.1) | 100% (155/155) |
| G | Uncultured gamma proteobacterium clone TRK11 (AY874095.1) | 95% (160/152) |
| | Uncultured gamma proteobacterium clone LiUU-11-267 (AY509474.1) | 93% (150/160) |
| H | Unidentified bacterium WP4 (AF303929.1) | 100% (159/159) |
| | Pseudomonas fluorescens strain P69 (AF973265.1) Pseudomonas migule strain R43 (AY972286.1) Pseudomonas sp. cb3 (AF351240.1) | 99% (159/160) |
| | | |
| I | Unidentified bacterium clone 49511 (AF097805.1) | 98% (153/156) |
| | Uncultured bacterium PHOS-HE51 (AF314433.1) | 93% (145/155) |
| J | Uncultured planctomycete clone PLA16 (AY167666.1) Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete KOLL2a (AJ250882.1) Uncultured anoxic sludge bacterium KU2 (AB054007.1) | 99% (160/161) |

20 クローンを DGGE でグループ分けを行なったところ、10 グループに分かれ、菌の種類が豊富なことが分かった。その中に KU2 との相同性が 100%の菌と 99%の Anammox 菌が存在していた (B、J グループ)。これは種汚泥の Anammox グラニュールが KU2 を含むことを 1)の実験により確認しているため、予想通りの結果だった。KU2 と高い相同性を示した菌の数が 10 クローンと約半数であるため、このリアクタ中の主要な菌ではないかと考えられる。より正確な割合を求めるためにはリアルタイム PCR による解析が有効である。

また、CANON リアクタの培地は Anammox 反応の基質である亜硝酸を含んでいないため、系内にはアンモニア酸化細菌が存在しているはずであるが、この実験では検出できなかった。

全ての細菌について、さらに相同性検索をかけ、リアクター内でどのような役割を有するかを考察した。グループ I の Unidentified bacterium clone 49511 は *Hypomicrobium* と近縁の糸状の長い足をもつ微生物であり、活性汚泥中によく存在していて増殖すると汚泥沈降性や脱水性が悪化するといわれてい

る。*Hyphomicrobium denitrificans* は N_2O (Nitrous Oxide)還元酵素、亜硝酸還元酵素を有する脱窒菌であるという報告がある²⁷⁾。他の Anammox リアクターからもこの細菌が見つかることから、亜硝酸が必ず存在する Anammox の実験系内で脱窒を行っているのではないかと推察される。その他の細菌については Anammox との関連を伺わせる有力な情報が得られなかった。

3) 改良 DGGE 法による菌相解析結果

CANON リアクターから経時的に採取したグラニューール汚泥 (13day (2004/5/6), 63day (2004/6/25), 103day (2004/8/4), 206day (2004/11/15), 265day (2005/1/13)) およびフロック汚泥 (63day (2004/6/25), 206day (2004/11/15), 265day (2005/1/13)) を対象に解析を行った。プライマー-357F と 534R を用いた PCR 産物をゲル抽出した後、アガロースゲル電気泳動で濃度確認を行い、マーカのバンドの濃さと比較して泳動した DNA 濃度を約 15 ng/ μ l と推定した。そこで 30 ng(2 μ l)を鋳型として 357F+GC-Clamp と 534R で PCR を行い、GC クランプを付加した。PCR 増幅の結果、すべてのサンプルで目的とする約 250 bp に DNA の増幅のバンドを確認できた。これらのサンプルの濃度を、分光光度計を用いて測定した。そして、各サンプルの DNA 量が 2000 ng になるように調整し、DGGE 泳動サンプルとした。ゲルの観察を SYBR Gold で一番感光のある波長で観察できるフルオロ・イメージアナライザー (FUJIFILM) で行なった DGGE 泳動結果を Fig.6-11 に示す。

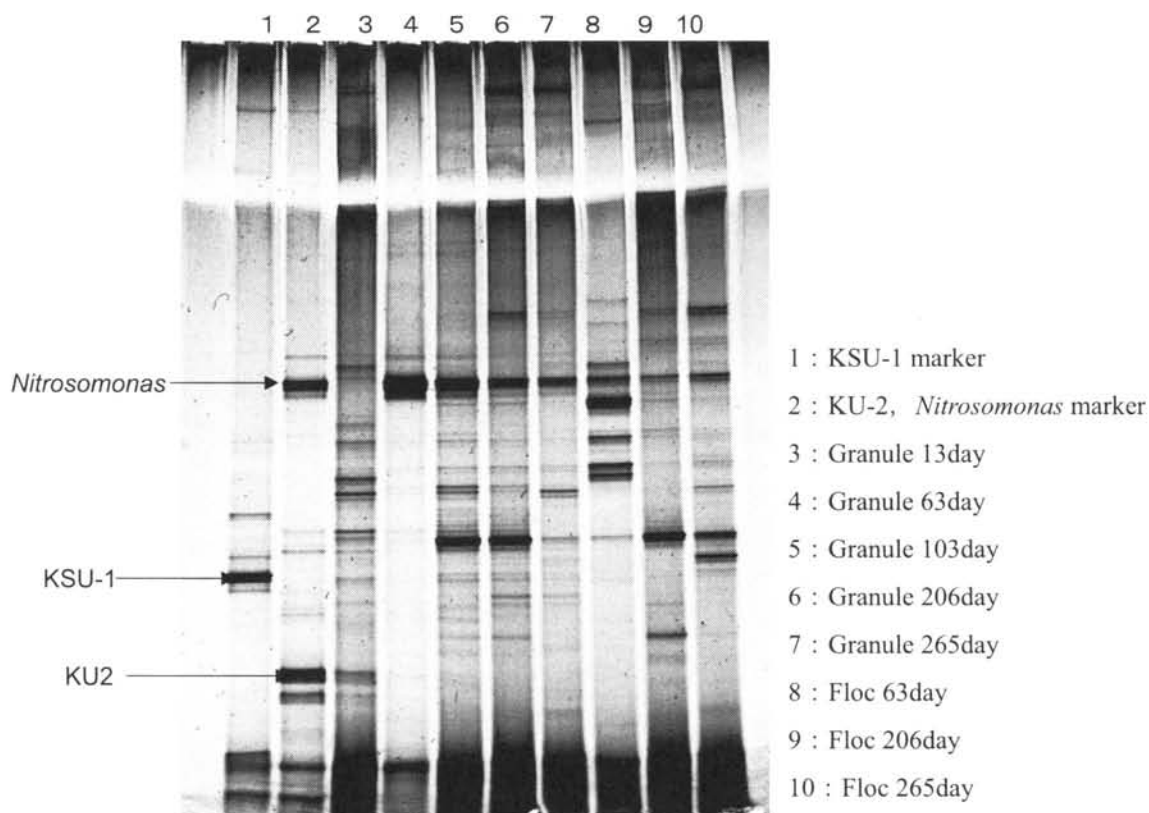


Fig.6-11 DGGE patterns of all samples observed by Fluoro- image analyzer

グラニューール 13day については、KU-2 がほぼ半数を占め *Nitrosomonas* が存在しないという以前に行ったクローニングによる菌相解析の結果と一致した。KU-2 はグラニューール 13day にのみ存在し、その他のサンプルでは確認できなかった。グラニューール 103day、206day、265day には KSU-1 のマーカーに

位置に近いバンドが見られた。初期グラニュールには KSU-1 のバンドはみられなかったことから、KSU-1 の初期量が非常に微量であったか、あるいはコンタミネーションが起こった可能性がある。

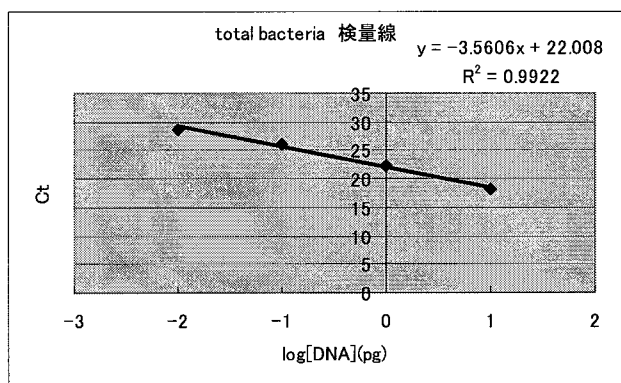
Nitrosomonas はグラニュール 13day には存在しておらず、グラニュール 63day に最も多く存在し、時間が経つとともに次第に減少していくことがわかった。

フロックの菌相は 63day と後の 2 サンプル (206day、265day) で大きく異なっていた。これは、140day にリアクター中のフロック汚泥の大半を引き抜いたことによる。140day 以降のフロック汚泥は主にグラニュールに付着していた汚泥から増殖したものであり、フロック 206day とグラニュール 206day の菌相は非常に似ているのはこのためと考えられる。同じく 217day にもフロック汚泥を除いた。フロック 265day とグラニュール 265day の菌相は似ているが、バンドの濃さは異なっており、フロックにより多く存在する菌があることがわかる。206day と 265day は同じ菌が主要な存在になっていたが、いくつか異なったバンドが見られ、菌相が少し変化していることがわかる。

実験 1)、2)、3)の結果から、リアクター内のグラニュールには、運転開始後に *Nitrosomonas europaea* が増殖し、その量は初期には多いが徐々に減少すること、グラニュール中の Anammox 菌の存在割合は低下すること、経時的に主要な菌が限定されてくることがわかった。初期に添加したフロックは複雑な菌相を有していたが、一度引き抜いた後は菌相が単純化したことが示唆された。グラニュールとフロックの菌相は似ているが、どちらかに選択的に増殖している菌の存在が確認された。

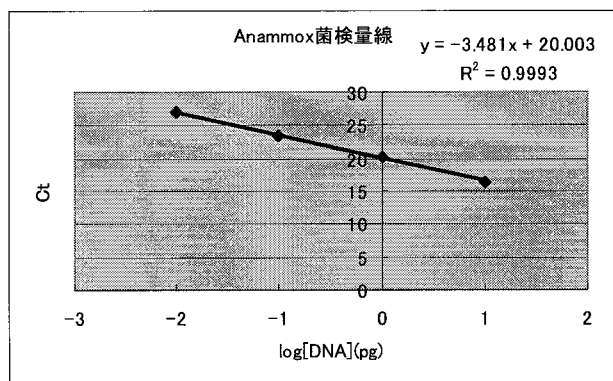
6-3-5 アンモニア酸化菌・Anammox 菌の存在割合の変化

全バクテリア、Anammox 菌、硝化菌それぞれの検量線を Fig.6-12~6-14 に、各サンプルの消光サイクルを Table 6-14 に示す。



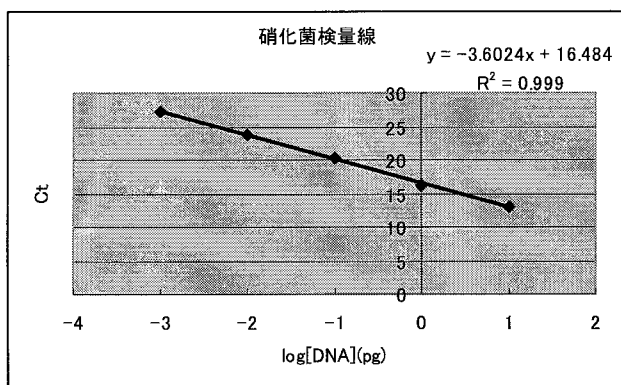
| log[DNA](pg) | Ct |
|--------------|-------|
| 1 | 18.11 |
| 0 | 22.30 |
| -1 | 25.97 |
| -2 | 28.76 |

Fig.6-12 Calibration curve of all bacteria (amplification efficiency 1.91)



| log[DNA](pg) | Ct |
|--------------|-------|
| 1 | 16.42 |
| 0 | 20.17 |
| -1 | 23.46 |
| -2 | 26.93 |

Fig.6-13 Calibration curve of anammox bacteria (amplification efficiency 1.94)



| log[DNA](pg) | Ct |
|--------------|-------|
| 1 | 12.86 |
| 0 | 16.30 |
| -1 | 20.39 |
| -2 | 23.70 |
| -3 | 27.18 |

Fig.6-14 Calibration curve of aerobic ammonium oxidizer (amplification efficiency 1.89)

Table 6-14 Quenching cycle

| | Quenching cycle (Ct) | | |
|----------------|----------------------|------------------|---------------------------|
| | All bacteria | Anammox bacteria | Aerobic ammonium oxidizer |
| Granule 13day | 21.833 | 22.755 | 26.120 |
| | 22.250 | 22.088 | 26.529 |
| | 22.112 | 21.960 | 26.653 |
| Average | 22.065 | 22.268 | 26.434 |
| Granule 63day | 20.599 | 23.158 | 18.234 |
| | 20.860 | 23.257 | 18.535 |
| | 20.739 | 23.149 | 19.155 |
| Average | 20.733 | 23.188 | 18.641 |
| Granule 103day | 19.974 | 23.492 | 18.878 |
| | 19.839 | 23.538 | 19.042 |
| | 20.422 | 23.464 | 19.065 |
| Average | 20.078 | 23.498 | 18.995 |
| Granule 206day | 20.480 | 24.601 | 19.841 |
| | 20.807 | 25.286 | 19.930 |
| | 20.440 | 24.580 | 20.170 |
| Average | 20.576 | 24.822 | 19.980 |
| Granule 265day | 21.365 | 23.460 | 20.723 |
| | 21.648 | 23.543 | 20.737 |
| | 20.925 | 23.337 | 20.928 |
| Average | 21.313 | 23.447 | 20.796 |
| Floc 63day | 20.524 | 24.331 | 20.448 |
| | 20.545 | 24.282 | 20.416 |
| | 20.388 | 24.361 | 20.607 |
| Average | 20.486 | 24.325 | 20.490 |
| Floc 206day | 19.333 | 25.070 | 19.740 |
| | 19.250 | 25.198 | 19.919 |
| | 19.624 | 25.198 | 19.836 |
| Average | 19.402 | 25.155 | 19.832 |
| Floc 265day | 21.229 | 25.544 | 20.436 |
| | 21.463 | 25.143 | 20.646 |
| | 21.061 | 25.417 | 20.795 |
| Average | 21.251 | 25.368 | 20.626 |

消光サイクルの値から式(6-11)により DNA 量を算出した。Table 6-15 に示す増幅 DNA の大きさの関係から Anammox 菌は 1.659 倍 (350/211)、硝化菌は 3.017 倍 (350/116) した。PCR 産物の長さを考慮して DNA 量を計算した定量値を定量値を Table 6-16 に示す。() には、その菌の全バクテリアに占める割合を%で示した。

$$\text{DNA 量} = 10^{(\text{Ct の平均} - \text{検量線の切片}) / (\text{検量線の傾き})} \quad (6-11)$$

Table 6-15 Size of PCR products

| | primer | Size of PCR products |
|---------------------------|---------------|----------------------|
| All bacteria | 16S6F | 350 bp |
| | EUB338 I + II | |
| Anammox bacteria | Ana-5' | 211 bp |
| | Ana-3' | |
| Aerobic ammonium oxidizer | CTO189fMC | 116 bp |
| | RT1r | |

Table 6-16 Quantitative value of DNA and the ratio of anammox bacteria and aerobic ammonium oxidizer to all bacteria

| | All bacteria | Anammox bacteria | Aerobic ammonium oxidizer |
|----------------|--------------|------------------|---------------------------|
| Granule 13day | 0.964 | 0.371 (38.48%) | 0.00521 (0.54%) |
| Granule 63day | 2.281 | 0.202 (8.85%) | 0.760 (33.31%) |
| Granule 103day | 3.483 | 0.164 (4.72%) | 0.606 (17.40%) |
| Granule 206day | 2.525 | 0.0684 (2.71%) | 0.323 (12.79%) |
| Granule 265day | 1.568 | 0.170 (10.85%) | 0.192 (12.23%) |
| Floc 63day | 2.676 | 0.0951 (3.56%) | 0.233 (8.71%) |
| Floc 206day | 5.393 | 0.0549 (1.02%) | 0.355 (6.58%) |
| Floc 265day | 1.631 | 0.0477 (2.92%) | 0.214 (13.10%) |

リアルタイム PCR を行った結果、グラニューール 13day には Anammox 菌が 38%程度で硝化菌はほとんどいないことがわかった。この結果は DGGE の結果と一致している。

Table 6-16 の結果をグラフ化したものを Fig.6-15 に示す。グラニューール内の Anammox 菌の割合は、初回のサンプルは 38.5%であったが 63day 以降は 10%以下に大きく低下し、206day まで経時的に低下した。アンモニア酸化菌の割合は 63day に 0.5%から 33.3%と大きく上昇してその後は経時的に低下した。しかし、グラニューール 265day は Anammox 菌が 10%程度に増えており、硝化菌の減少も 0.56%とわずかであった。フロックはすべてのサンプルに Anammox 菌が存在しており (1.0~3.6%)、硝化菌は 6.6~13.1%であった。全てのサンプルにおいてアンモニア酸化菌の方が多く存在しており、グラニューールと比較すると割合の変化が小さかった。Anammox 菌に対する硝化菌量の比をグラニューールとフロックで比較すると、63day はグラニューールの方が高いが、206、265day はフロックの方が高かった。

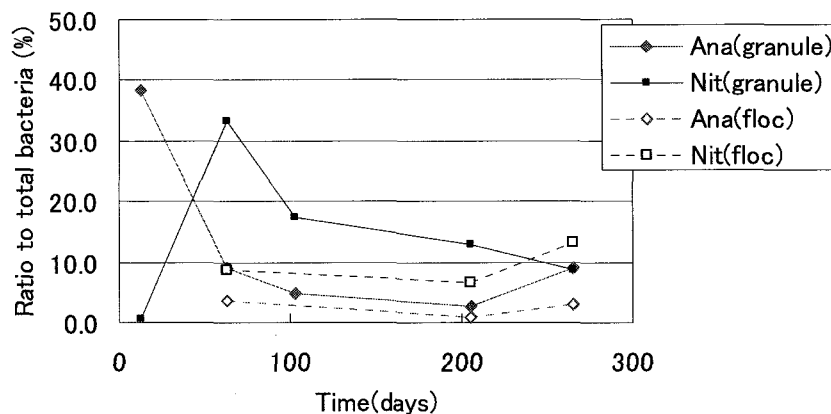


Fig.6-15 Change of the ratio of anammox bacteria and aerobic ammonium oxidizer to all bacteria existing in granules and flocs; Ana: anammox bacteria, Nit: anaerobic ammonium oxidizer (*Nitrosomonas*)

リアクターの Anammox 反応速度およびアンモニア酸化反応速度の変化とそれぞれの菌の割合の変化を比較する。グラフを Fig.6-16-a、Fig.6-16-b に示す。

Anammox についてみると、菌の割合が低下した 63day 以降もリアクターの Anammox 反応速度は大きく変化せず、103day には高い値を示している。206、265day は 13day と比較すると反応速度が 70%、64%に低下したが、菌の割合が 7%、24%に低下したことと比較するとその度合いは小さい。グラニューール中のアンモニア酸化菌についてみると、63day に大きく上昇しその後は低下しており、Anammox 菌の割合と逆の傾向がみられる。グラニューール中の Anammox 菌の割合が低下した理由は、菌数が減少したのではなく、アンモニア酸化菌を含む好気性菌が増殖したことによって Anammox 菌の割合が相対的に低下したためではないかと考えられる。また、13day から 103day までの菌量と活性の変化は、Anammox 菌体量当たりの Anammox 活性（比活性）が、経時的に上昇したとも解釈できる。Anammox 菌は嫌気性であるため、運転開始直後は比活性が低下し、その後グラニューールの外側にアンモニア酸化菌が増殖して内部の嫌気条件が確立されると、比活性が徐々に上昇したと推測される。DO による反応阻害は可逆性であることは根拠の一つである²⁸⁾。

グラニューール中の Anammox 菌、アンモニア酸化菌以外の菌の割合は、13day の約 60%から 265day には約 80%に増加した。これは、無酸素条件から好気（低 DO 濃度）条件に変更したことにより、これまで存在していなかった硝化菌以外の好気性菌が増殖したためであろうと考えられる。

グラニューールのアンモニア酸化菌は 63day 以降一貫して低下し、フロックにはわずかながら増加傾向がみられた。Anammox 菌に対する硝化菌量の比がグラニューールよりフロックの方が高いことから、アンモニア酸化菌はグラニューールよりもフロック中で増殖する傾向があるのではないかと推測される。

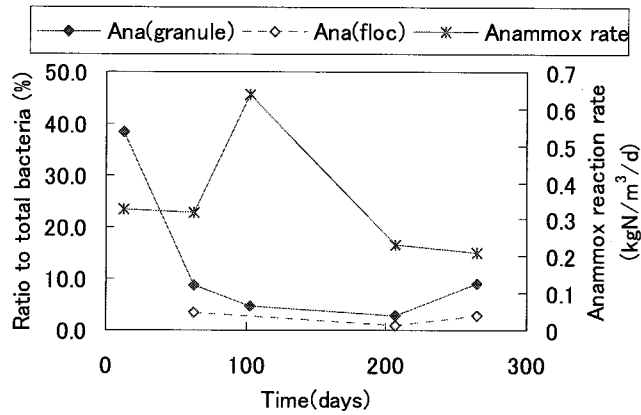


Fig.6-16-a Change of the ratio of anammox bacteria to all bacteria and anammox reaction rate in the reactor

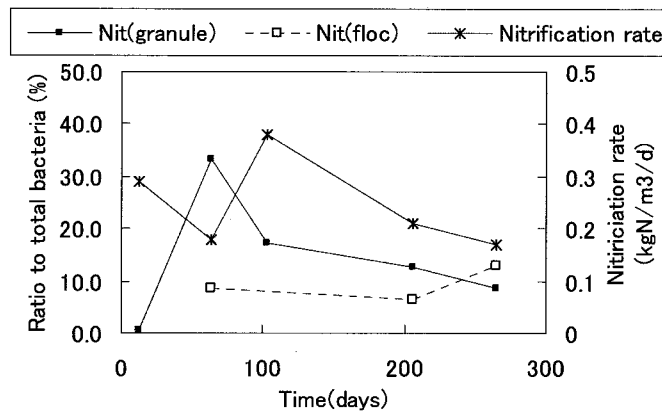


Fig.6-16-b Change of the ratio of aerobic ammonium oxidizer to all bacteria and nitrification rate in the reactor

6-3-6 グラニュールとフロック汚泥の硝化速度変化

硝化速度測定の実験を、フロックについて3回(63、140、206day)、グラニュールについて2回(63、206day)行った。フロックの3回の測定結果およびグラニュール206dayの測定結果をFig.6-17に示す。フロック63dayの結果では NO_3^- 生成はほとんどみられず、フロック内の亜硝酸酸化菌量が少ないと推測される。140day以降の結果では、 NO_2^- の蓄積がみられるがその後 NO_3^- へ酸化されている。グラニュールについては、63dayのグラニュールを用いた実験では硝化は全く起こっていなかったが(グラフなし)、206dayには、 NO_2^- の蓄積がほとんどなく NH_4^+ が NO_3^- へ変換された。

この結果より、運転日数が長くなるにつれ、フロック・グラニュール両方にアンモニア酸化菌に加えて亜硝酸酸化菌が増殖することが分かった。グラニュールの硝化速度実験では NO_2^- の蓄積がなく即座に NO_3^- へ変換されていることから、アンモニア酸化菌/亜硝酸酸化菌の比率がフロックよりも小さいと考えられる。

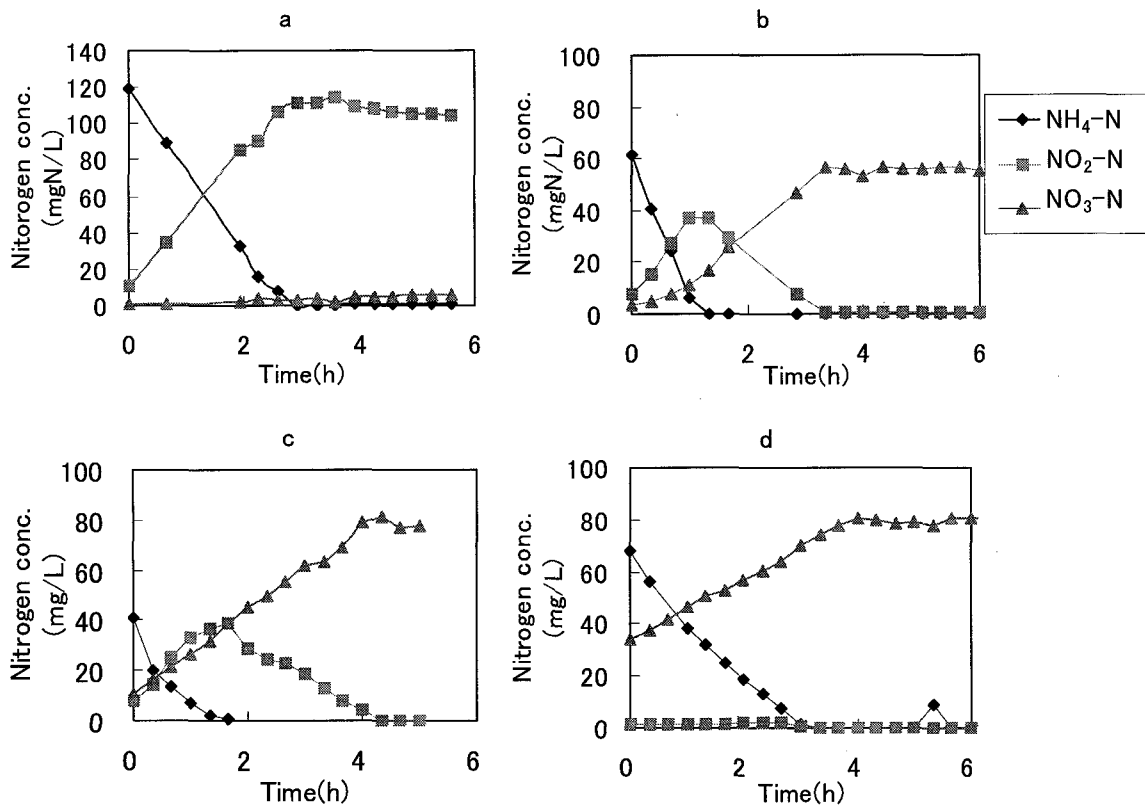


Fig.6-17 Nitrification profile for floc and granules (a: floc 63day, b: floc 140day, c: floc 206day, d: granule 206day)

汚泥当たりの硝化速度の変化を **Fig.6-18** に示す。グラニュール・フロックともに時間経過に伴って汚泥当たりの硝化速度が上がっており、特にグラニュールに比べフロックの硝化速度が著しく上昇している。この結果より、亜硝酸酸化菌はフロック中に主に増殖すること、グラニュール中にも存在していることがわかった。硝化抑制のためには、系内に増殖した亜硝酸酸化菌を取り除くことができればよい。フロック汚泥を取り除くことによって亜硝酸酸化菌を減らすことは可能であるが、グラニュールに付着したものを除去することは不可能であり、硝化を完全に抑制することはできないと言える。

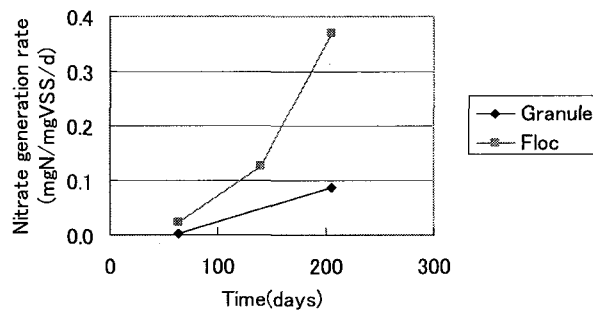


Fig.6-18 Changes in nitrate formation rate for granules and floc

Fig.6-11 を見ると、フロックについては 63day と 206day で大きく菌相が変わっている。亜硝酸酸化

菌は 63day ではなく 206day に出てきたバンドのうちの一つであると推定される。硝化速度実験で 140day のサンプルで亜硝酸酸化が起こっていたことから、菌相もこの時点で変わっていたのではないかと考えられる。グラニュールについても同様に、亜硝酸酸化菌は 63day ではなく 206day に出てきたバンドのうちの一つであると推定される。

6-3-7 フロック汚泥の処理速度への寄与

リアクタ内のフロック増加速度の測定を 30 日間行った。実験期間中の処理水の NH_4^+ 濃度は 77~143mg/L であり、DO 濃度は 0.17~0.62mg/L (平均 0.44mg/L) であった。フロック量の経時変化を Fig.6-19 に、また同じ期間の Anammox、亜硝酸化、硝酸化速度の変化を Fig.6-20 に示す。

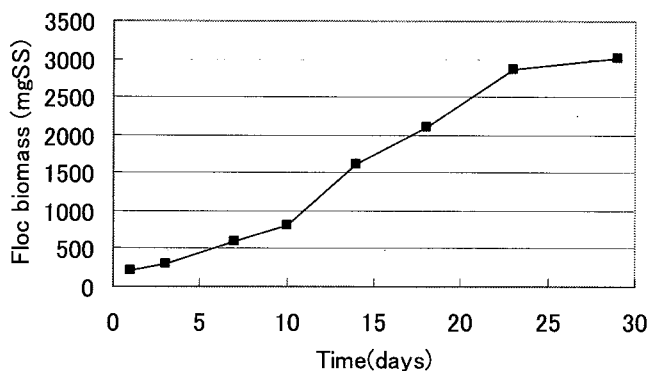


Fig.6-19 Changes in floc biomass in the reactor

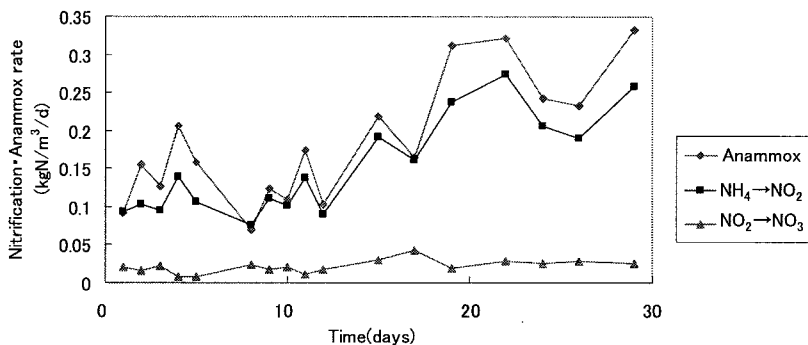


Fig.6-20 Changes in nitrification and anammox reaction rate

フロック量は最初の二週間は対数増殖を示し、その後は増殖速度が下がった。最初の二週間の増殖速度 μ は 0.152(1/d)と計算され、平均倍化時間は 4.6(d)であった。硝化菌の最大増殖速度に関しては、Activated sludge model No.2 では、硝化菌の増殖速度(μ_{AUT})を 1(1/d)、死滅速度(b_{AUT})を 0.15(1/d)、温度係数 $\theta = 0.105$ としている²⁹⁾。また、McBrideら(1999)は、硝化菌の増殖速度を 17.5°Cにおいて 0.2(1/d)、20.1°Cにおいて 0.5(1/d)、死滅速度を 0.05(1/d)としている³⁰⁾。これに比べると今回得られた 0.152(1/d)という値は小さい。この理由は、DO 濃度が低く制御されていることにより硝化菌の増殖が抑制されているためであると推察される。

Fig.6-20 の 1 日目のデータからグラニュールのみでも CANON のシステムは成立することがわかるが、窒素除去速度は 0.10kgN/m³/d と低い。これはグラニュールに付着しているアンモニア酸化菌量が少なく、存在している Anammox 菌の基質となる NO_2 が十分生成されないためであると推察される。フロ

ック量の増加とともに亜硝酸化速度が上がり、同時に Anammox 速度も上がった。フロック中のアンモニア酸化菌が経時的に増殖し、それによって生成される NO_2^- が増加し、基質となる NO_2^- が増えるために Anammox 速度が上がっていると考えられる。実験開始時と終了時の差がフロックの寄与であると考え、本実験でのフロックの寄与率は 70% と非常に高かった。高い窒素除去速度を得るためには、アンモニア酸化菌を系内に十分量存在させることが必要であり、そのためにはフロック汚泥の存在が必要であることが示された。また、6-3-6 の硝化速度実験結果からフロックおよびグラニューール中には亜硝酸酸化菌も増殖していることが明らかとなったが、低 DO で運転することにより硝酸化が抑制されていることがわかった。

全実験期間のリアクターの反応速度、溶存酸素 (DO)、HRT (水理的滞留時間)、窒素除去率の変化を Fig.6-21 に示す。

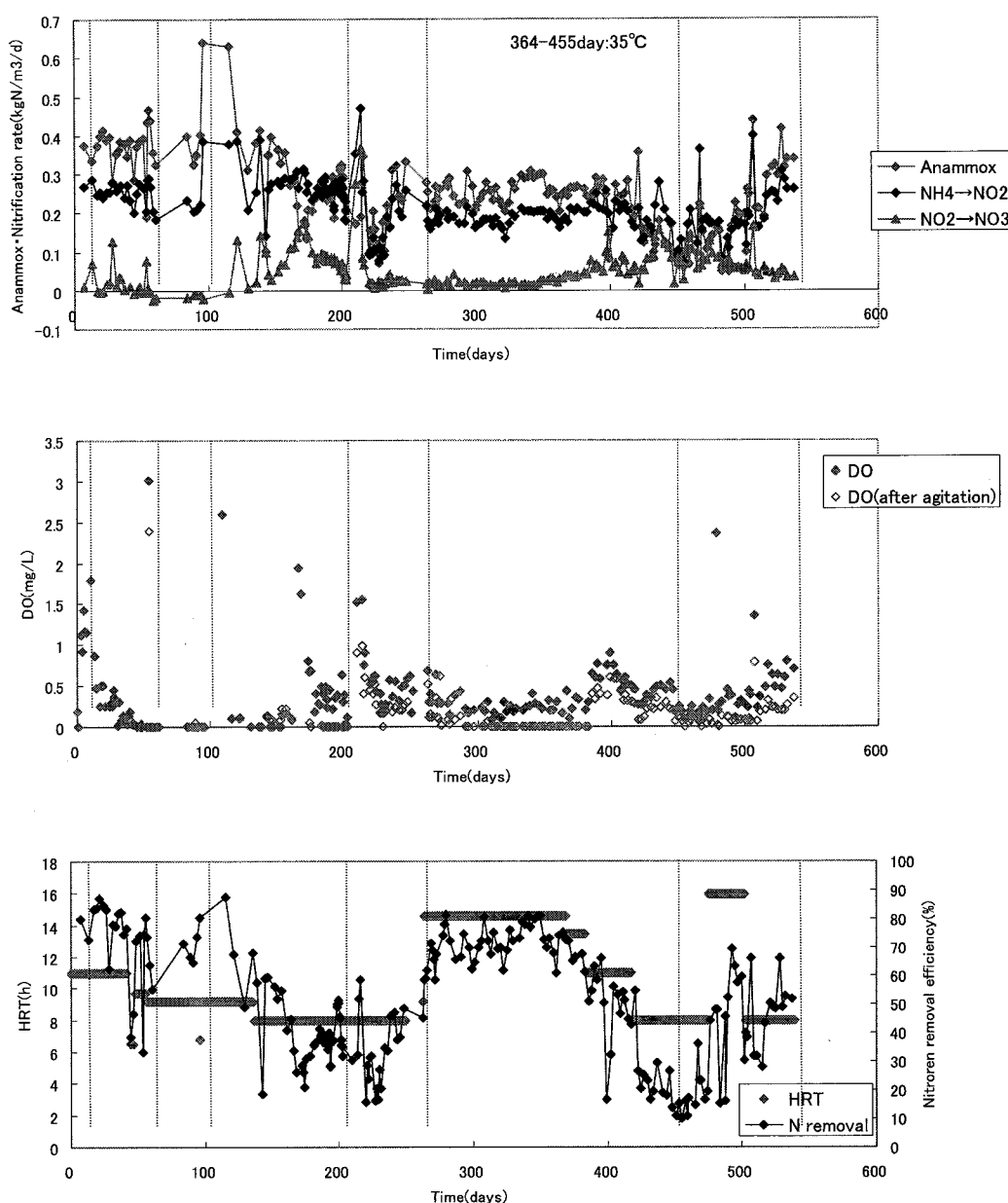


Fig.6-21 Results of CANON reactor operation for 540days; a: Reaction rate, b: DO concentration, c: HRT and nitrogen removal ratio.

図中点線で示したのは菌相解析用のサンプルを採取した日である。147～183day に 6-3-3 に示す環境因子の検討実験を行ったため、一時的に硝酸化速度が大きく上昇したが、**Fig.6-11** を見ると実験前の 103day と実験後の 206day でグラニューール中の主要な菌は変わらなかった。

第4節 結語

本研究では Anammox グラニューールを用いたガスリフトリアクターでの CANON 法の立上げと、亜硝酸化反応、Anammox 反応、硝酸化反応のバランスに対する影響因子の解析およびリアクター内の菌相解析を行った結果から以下の知見が得られた。

Anammox グラニューールを用いることにより早期立上げが可能であり、Anammox グラニューールとアンモニア酸化菌を用いて立ち上げたガスリフト CANON リアクターは、1 ヶ月の立ち上げ期間で最大 $0.62\text{kgN/m}^3/\text{d}$ の窒素除去速度を有し、添加 Anammox グラニューールの有するアンモニア除去速度能力に対し 56%の能力を持つことが確認された。

運転開始直後は NO_2^- が残存するが、Anammox グラニューール表面に硝化菌が増殖し嫌気条件が形成されることにより Anammox 速度が上昇し、 NO_2^- が低下する。処理能力に対し低い負荷にすることで、処理水の NH_4^+ 、 NO_2^- 濃度 10mgN/L 以下で運転できる。

CANON リアクターの窒素除去率に大きな影響を及ぼす因子は DO 濃度であり、安定した DO 濃度の制御が処理能力の向上につながる事が分かった。系内の Anammox 微生物の活性を保つため、DO 濃度 0.6mg/L 以下で運転することが必要である。高 DO 濃度では Anammox 反応は阻害により低下し、アンモニア酸化速度が上昇するため NO_2^- 濃度の蓄積が起こる。Anammox への阻害は DO 濃度を戻すことにより回復するが、亜硝酸酸化菌の存在量が増加するため、亜硝酸酸化速度は高 DO 運転前より上昇する。硝酸化を抑制し、かつ高い窒素除去速度を保つためには、DO 濃度を $0.2\sim 0.5\text{mg/L}$ で運転することが望ましい。DO 濃度の制御方法としては、流入 NH_4^+ 負荷に対し空気量の調整を行うか、DO 濃度を指標として空気量の調整を行うことが有効である。その他の運転管理は容易であり、本実験では平均窒素除去速度 $0.4\text{kgN/m}^3/\text{d}$ 、平均窒素除去率 74.0% で 4 ヶ月間安定して処理を行うことができた。

リアクター内のフロックおよびグラニューールには、アンモニア酸化菌だけでなく亜硝酸酸化菌も経時的に増殖したが、DO 濃度を低く保つことにより、亜硝酸酸化速度の上昇は抑えられた。フロック中のアンモニア酸化菌は Anammox 反応に必要な亜硝酸の生成に貢献しており、高い窒素除去速度を得るためには、フロックで存在するアンモニア酸化菌の存在が必要である。

リアクター内の菌相は種汚泥として用いた Anammox グラニューールからは大きく変化し、*Nitrosomonas europaea* と同源性を示す細菌が主要な存在となった。本実験の CANON リアクター内ではアンモニア酸化をこの細菌が担っていることが強く示唆された。硝化速度実験から亜硝酸酸化菌の存在が確認されたため、菌の同定を試みたい。グラニューールとフロックの菌相は似ているが、どちらかに選択的に存在する菌の存在も確認された。

安定した亜硝酸型硝化が困難な 200mgN/L 以下の低濃度含アンモニア排水を対象とした処理方法として本法は有効であると考えられる。本法では処理水中に、流入アンモニア濃度に対し 10～20%の硝酸が残存する。直接放流する場合には後段に従属微生物を用いる小型の脱窒槽を設ける必要があるが、有機物処理のための排水処理設備を有する場合には、有機物濃度が低くアンモニア濃度高い排水のみを選択的に本法で処理し、処理水を他の排水と混合する方法によって、効率的な窒素除去が可能であると考えられる。

第6章参考文献

- 1) Van de Graaf, A.A., Mulder, A., Slijkhuys, H., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1990) Anoxic ammonium oxidation, Proc.5th European Congress on Biotechnology, 1, 388-391.
- 2) A.Mulder, A.A.van de Graaf, L.A.Robertson, J.G.Kuenen (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in denitrifying fluidized bed reactor,FEMS Microbiology Ecology,Vol.16, pp.177-184.
- 3) Verstraete,W. and Philips,S. (1998) Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts, Environmental Pollution, 102(1), S1, 717-726.
- 4) Schmidt,I., Sliemers,O., Schmid,M., Bock,E., Fuerst,J., Kuenen,J.G., Jetten,M.S.M. and Strous,M. (2003) New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater, FEMS Microbiology Reviews, 27(4), 481-492.
- 5) 古川憲治 (2004) 嫌気性アンモニア酸化(Anammox)の発見とその後の研究開発動向, 水環境学会誌,27(7), 442-447.
- 6) 徳富孝明 (2004) anammox プロセス実用化の展望, 水環境学会誌, 27(7), 453-457.
- 7) 井坂和一 (2004) 嫌気性アンモニア酸化法の有効性と実用化に向けた課題と対策, 水環境学会誌,27(7), 458-462.
- 8) K.A.Third, A.Olav Sliemers, J.G.Kuenen, M.S.M.Jetten (2001) The CANON System (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under Ammonium Limitation : Interaction and Competition between Three Groups of Bacteria , System.Appl.Microbiol., 24,588-596.
- 9) A.Olav Sliemers, N.Derwort, J.L.Campos Gomez, M.Strous, J.G.Kuenen, M.S.M.Jetten (2002) Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor , Water Research, 36, 2475-2482.
- 10) A.Olav Sliemers, K.A.Third, W.Abma, J.G.Kuenen, M.S.M.Jetten (2003) CANON and Anammox in a gas-lift reactor , FEMS Microbiology Letters, 218, 339-344.
- 11) Michael Nielsen, Annette Bollmann, Olav Sliemers, Mike Jetten, Markus Schmid, Marc Strous, Ingo Schmidt, Lars Hauer Larsen, Lars Peter Nielsen, Niels Peter Revsbech (2004) Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor , FEMS Microbiology Ecology, 51, 247-256.
- 12) Hao X., Heijnen J.J. and Loosdrecht M.C.M. (2002) Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process, Biotechnology and Bioengineering, 77(3) 266-277.
- 13) Alfieri Pollice et al. (2002) Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate, Water Research, 36(10), 2541-2546.
- 14) Anthonisen,A.C., Loehr,R.C., Prakasam,T.B.S. and Srinath,E.G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, J. Water Pollt. Control Fed, 48(5), 835-852.
- 15) Hellings C., Schellen A.A.J.C., Mulder J.W., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. (1998) The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water, Wat. Sci. Tech., 37(9), 135-142.
- 16) Garrido J.M., van Benthum W.A.J., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. (1997) Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor, Biotech. Bioeng., 53, 168-178.
- 17) Bernat N., Dangkong N., Delgenes J.P. and Moletta R. (2001) Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor, J. Env. Eng., 127(3), 266-271.
- 18) Tokutomi,T. (2004) Operation of a nitrite-type airlift reactor at low DO concentration, Wat. Sci. Tech., 49(5-6), 81-88.
- 19) 遠矢泰典 (1970) 生物学的脱窒素法に関する研究(I), 下水道協会誌, 7(74), 21-42.
- 20) Imajo U., Tokutomi T., Furukawa K. (2004) Granulation of Anammox microorganisms in up-flow reactors, Wat. Sci.

- Tech., 49(5-6), 155-164.
- 21) Hao X., Heijnen J.J. and Loosdrecht M.C.M. (2002) Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification-ANAMMOX biofilm process, *Water Research*, 36, 4839-4849.
 - 22) Kanda J. (1995) Determination of ammonium in sea water based on the indophenol reaction with o-phenylphenol (OPP), *Water Research*, 29(12), 2746-2750.
 - 23) APHA, AWWA, WEF (1995) *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19th edition, USA.
 - 24) 日本下水道協会編 (1997) *下水試験方法*, 116-118, 269-271.
 - 25) Krassimira Hristova, Binyam Gebreyesus, Douglas Mackay, and Kate M. Scow (2003) Naturally Occurring Bacteria similar to the Methyl tert-Butyl Ether (MTBE)-Degrading Strain PM1 Are Present in MTBE-Contaminated Groundwater, *Appl Environ Microbiol.*, **69**, 2616-23.
 - 26) 時任博之, Anammox 処理の前処理としての部分亜硝酸化に関する研究, 熊本大学大学院自然科学研究科平成 15 年度修士論文
 - 27) Layton, A.C., Karanth, P.N., Lajoie, C.A., Meyers, A.J., Gregory, I.R., Stapleton, R.D., Taylor, D.E. and Sayler, G.S. (2000) Quantification of *Hyphomicrobium* Populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA Analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(3), 1167-1174.
 - 28) Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J.G. and Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6), 2446-2448.
 - 29) Henze M., Gujer W., Mino T., Matsuo T., Wentzel M. T. and Marais G. V. R. (1995) *Activated sludge model No. 2*. IAWQ Scientific and Technical Report No. 3, International Association for Water Quality, London (see also IAWQ errata sheet).
 - 30) Graham B. McBride and Chris C. Tanner (1999) Modelling biofilm nitrogen transformations in constructed wetland mesocosms with fluctuating water levels, *Ecological Engineering*, **14**(1-2), 93-106.

第7章 結論

閉鎖性水域の水質汚濁および富栄養化の対策として、第5次水質総量規制において従来のCODに加え窒素およびリンも総量規制の対象となった。窒素規制強化の流れに伴い、今後の規制エリア拡大の可能性も合わせて窒素処理技術に対するニーズは非常に高まっている。規制基準を達成するための処理システムの導入と経済的な運転が必須である。現状の硝化/脱窒の二工程での窒素除去法はエネルギーおよび薬品のコスト負担が大きいことから、より経済的な処理技術の開発が望まれている。1995年に初めて論文発表された嫌気性アンモニア酸化(anaerobic ammonium oxidation, Anammox)反応は、無酸素条件下で NH_4^+ が電子供与体、 NO_2^- が電子受容体となる独立栄養性の脱窒反応である。Anammoxを利用した、部分的亜硝酸化/Anammoxシステムが確立されれば、従来の硝化/脱窒プロセスに比べ、酸素供給量、外部炭素源の添加、余剰汚泥の発生量を大幅に削減でき、また N_2O などの温室効果ガスを発生しないなど、極めて経済的で低環境負荷の窒素除去プロセスの構築が可能となる。Anammox反応は窒素濃度が高くC/N比が低い排水の処理に適しており、ごみ浸出水や畜産廃液、消化脱離液や汚泥の脱水濾液等への活用が期待される。

本論文は、硝化/脱窒に替わる新規な窒素除去法として、Anammox反応を利用した高負荷型窒素除去システムを構築することを目的として平成10年から行った研究をまとめたものである。活性汚泥からのAnammox微生物の集積を試み、次に集積したAnammox微生物を用いた窒素除去プロセスの実排水への適用を目的として、浮遊法、固定床、流動床といったリアクター形状の検討を行った。検討結果をもとに、微生物の特徴に合致し、かつ高負荷が期待できるAnammoxグラニュールリアクターの構築を目指し、Anammox微生物のグラニュール化の検討をラボスケールとパイロットスケールのリアクターを用いて行った。次にAnammoxグラニュールリアクターの運転条件について、温度、pH、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度について実験を行い、至適範囲を知るとともに至適範囲を外れた場合の活性への影響を把握する目的で検討を行った。さらに、Anammoxグラニュールを活用した単一型窒素除去リアクターとして、部分亜硝酸化とAnammoxを同一槽内で行わせるCANON (Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite) 法をガスリフト型リアクターで検討した。

第2章では、活性汚泥からのAnammox微生物の集積培養を試みた。約3ヶ月間の回分培養によりAnammox活性を検出し、その後の回分培養により微生物を集積培養することができた。下水汚泥とし尿処理汚泥からは1年以上の培養期間を経てもAnammox活性が確認できなかったが、2回目の種汚泥の選定では2種類の汚泥からAnammox活性が確認できた。長いSRTで運転されている硝化/脱窒プラントの汚泥に着目することがAnammox微生物を探索するのに有効であること、またAnammox反応によるアンモニアの減少を検出するためには、自己消化によるアンモニア生成を終了させるために長い時間を要することが示唆された。培養された汚泥の16S rDNA解析により、それぞれの汚泥には*Candidatus Brocadia Anammoxidans*、*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*に近縁の、別の系統に属するAnammox微生物(KU-1 (Accession No.AB054006), KU-2 (AB054007)と命名)が存在することが確認された。活性汚泥からのAnammox微生物の集積培養が可能であり、国内に複数種のAnammox微生物が存在していることが示された。

第3章では、浮遊増殖型リアクターとして沈殿槽を有しないシーケンシャルバッチ方式の浮遊型リアクター、固定床型リアクターとして不織布を充填した上向流リアクター、流動床型リアクターとしてプラスチック筒状担体を付着担体とする上向流リアクターを選択し、これら3種類のリアクターを

用いた実験により、Anammox 微生物を用いた連続培養には、浮遊増殖型、固定床型、流動床型いずれのリアクターも用いることが可能であるが、酸素混入による活性低下を防ぎ、安定した処理を行うには生物膜型である固定床型、流動床型の方が良いことが示された。リアクター容積負荷は担体表面積が大きい流動床型が最も大きく、筒状担体リアクターでは最大 $2.38 \text{ kg N/m}^3/\text{d}$ を達成した。担体充填量、種類、サイズの検討により、より高い負荷が期待できると考えられる。

第4章では、第3章で得られた知見をもとに、安定した処理が行える流動床リアクターの考え方を発展させ、高負荷が期待できる Anammox グラニュールリアクターの構築を目指した。UASB 法のメタン菌グラニュールを付着担体として Anammox 微生物を増殖させ、メタン菌グラニュールを核とした Anammox グラニュールの形成を試みた。合成基質を用いたラボスケールリアクターと嫌気消化脱離液を用いたパイロットスケールリアクターで検討を行った結果、Anammox 微生物は両方のリアクターにおいてメタン菌グラニュールの表面に付着し増殖した。さらに、新しい Anammox グラニュールの生成も確認された。グラニュールの大きさや物理的特徴は UASB 法のメタン菌グラニュールと同程度であったことから、実在している数多くの UASB リアクターに関するノウハウを Anammox グラニュールリアクターの開発に利用できると考えられる。自己造粒させるのではなく、メタン菌グラニュールを担体として用いるこの方法は、立上げ期間を大幅に短縮することを期待して採用した。この方法によって、1年以内に $6 \text{ kg N/m}^3/\text{d}$ 以上の高い窒素除去速度を得ることができた。高負荷達成により、リアクターの小型化が可能となり、また塔型のグラニュールリアクターとすることで設置面積の縮小も可能となる。パイロットリアクターの処理結果から、Anammox グラニュールリアクターを嫌気消化脱離液からの窒素除去プロセスとして利用可能であることが明らかとなった。

第5章では、Anammox グラニュールリアクターの運転条件、特に実際の運転においてトラブルが発生しやすいと予想される温度、pH、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度について、至適範囲を知るとともにトラブル時のリアクターの状態を把握する目的で検討を行った。

$23\sim 35^\circ\text{C}$ の範囲で影響を調べた結果、Anammox 反応に関する活性化エネルギー (E) は 56.3 kJ/mol と算出された。懸濁状態で測定された既報の値 70 kJ/mol より小さい値となったのは、Anammox 微生物がグラニュールで存在しており、基質の拡散が温度の影響を受け、かつ増殖速度が懸濁状態と比較すると小さくなるためではないかと推察される。回分実験によりグラニュールでの Anammox 反応は $\text{NH}_4\text{-N} \cdot \text{NO}_2\text{-N}$ が $2\sim 4 \text{ mgN/L}$ までは 0 次反応で表せることが確認できた。

pH については、リアクターの反応ゾーン内に、 $\text{pH} 7.0\sim 8.5$ のエリアをより多く確保することが必要であった。Anammox 反応により pH が上昇することを考慮し、上向流式のリアクターの場合には上部の pH を 8.5 以下になるよう底部 pH を設定する必要がある。その設定値は 6.3 以上とする。低部の pH 条件が低い場合 (< 6.3) も、高い場合 (> 7.9 、出口 $\text{pH} > 8.28$) も、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度の低下は低部 pH を 7 付近に戻すことにより数時間から 2~3 日以内に回復した。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去と $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去に対する pH の影響が異なることが示唆された。酸性側への pH 変化の影響は $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去よりも $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去の方が大きく、逆にアルカリ性側への影響は $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去よりも $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去の方が大きく受けた。Anammox 反応において $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ の反応にはそれぞれ異なった酵素が関与していることから、本実験での結果の違いは、それぞれの酵素に対する pH の影響が異なっているためではないかと推察される。

Anammox グラニュールを用いた上向流リアクターにおいて、流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が 300 mgN/L 以上では $\text{NO}_2\text{-N}$ により Anammox 反応が阻害された。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去速度の方がより低濃度から $\text{NO}_2\text{-N}$ の阻害を受けることが示唆された。流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が $300\sim 350 \text{ mgN/L}$ では $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度は保たれるもの

NO₂-N 除去速度が不安定になり、350mgN/L 以上では NH₄-N・NO₂-N 両方の除去速度の低下がみられた。高濃度 NO₂-N による除去速度の低下は、NH₄-N 除去速度より NO₂-N 除去速度の方が顕著で、除去 NO₂-N/NH₄-N 比率が低下した。処理水中に NO₂-N 濃度が高濃度で残存すると Anammox 反応が阻害を受けることから、処理水 NO₂-N 濃度を 100mgN/L 以下のできる限り低い濃度に維持することが望ましい。処理水中に NO₂-N が残存する場合において (>50mgN/L)、グラニューールの浮上によるグラニューールベッド体積の大幅な減少が見られた。浮上したグラニューールはガスを内包しており、それを再利用する場合には何らかの方法でグラニューールを破壊し、ガスを放出する必要がある。NO₂-N 除去率 90% 以上を達成するグラニューール体積あたりの NO₂-N 負荷の上限は 8.0kgNO₂-N/m³_{granule}/d (この時 TN 除去速度最大値は 12.9kgN/m³_{granule}/d) であった。汚泥負荷が同じであれば、流入 NO₂-N 濃度 (実験では 181~364mgN/L) を変えても汚泥あたりの除去速度は変わらなかった。しかし、流入 NO₂-N 濃度が 300mgN/L 以上では処理が不安定になることに留意すべきである。

リアクターの基質流入部の NO₂-N 濃度は約 300mgN/L まで許容可能であり、これ以上の濃い排水を処理する場合には処理水等で希釈する必要がある。グラニューールの大量浮上を防ぐには、窒素除去率を高くして処理水中の基質濃度を下げることが必要であり、そのためには系全体の汚泥あたりの窒素負荷の上限を設定しておく必要がある。汚泥当たりの窒素除去速度はグラニューール中の Anammox 微生物の存在割合によって変化するため、事前にグラニューールの能力評価をしておく必要がある。

反応を停止させた保存状態では、暴露される NO₂-N 濃度が高いほど、また暴露時間が長いほど活性の低下割合が大きかった。反応を停止させ保存する場合には NO₂-N 濃度は 200mgN/L 以下にし、また再立ち上げの際には、保存中に活性が低下することを考慮し負荷を下げて運転を開始する必要がある。

いずれの検討結果も既報の Anammox 微生物についての報告とは異なる結果となったが、微生物が懸濁状態ではなくグラニューールであるという存在形態の違い、グラニューール中の Anammox 微生物の割合が 100%ではないこと、リアクター内部に基質濃度勾配のある不完全混合リアクターであることなどが理由として挙げられる。実際のリアクターの運転においては、流入水の濃度や pH などの性状の変化、また運転中のトラブルも予想され、グラニューールの保存の必要性も出てくると考えられる。本章で得られた知見はリアクター設計や運転管理に役立つものと思われる。

第 6 章では、Anammox グラニューールを用いたガスリフトリアクターでの CANON 法の立上げと、亜硝酸化反応、Anammox 反応、硝酸化反応のバランスに対する影響因子の解析およびリアクター内の菌相解析を行った。CANON リアクターは 1 ヶ月の立ち上げ期間で最大 0.62kgN/m³/d の窒素除去速度を有し、添加 Anammox グラニューールの有するアンモニア除去速度能力に対し 56%の能力を持つことが確認された。処理能力に対し低い負荷にすることで、処理水の NH₄⁺、NO₂濃度 10mgN/L 以下で運転できた。窒素除去率に大きな影響を及ぼす因子は DO 濃度であった。高 DO 濃度では Anammox 反応の低下とアンモニア酸化速度の上昇のため NO₂濃度が蓄積する。Anammox 反応の阻害は DO 濃度を戻すことにより回復するが、亜硝酸酸化菌の存在量が増加するため、亜硝酸酸化速度は高 DO 運転前より上昇する。硝酸化を抑制し、かつ高い窒素除去速度を保つためには、DO 濃度を 0.2~0.5mg/L で運転することが望ましい。DO 濃度の制御以外の運転管理は容易であり、平均窒素除去速度 0.4kgN/m³/d、平均窒素除去率 74.0%で 4 ヶ月間安定して処理を行うことができた。リアクター内のフロックおよびグラニューールには、アンモニア酸化菌だけでなく亜硝酸酸化菌も経時的に増殖したが、低 DO 濃度運転により亜硝酸酸化速度の上昇は抑えられた。フロック中のアンモニア酸化菌は Anammox 反応に必要な亜硝酸の生成に貢献しており、高い窒素除去速度を得るためには、フロックで存在するアンモニア酸化菌

の存在が必要である。菌相解析の結果、本実験の CANON リアクター内ではアンモニア酸化を *Nitrosomonas europaea* が担っていることが強く示唆された。

安定した亜硝酸型硝化が困難な 200mgN/L 以下の低濃度含アンモニア排水を対象とした処理方法として本法は有効であると考えられる。本法では処理水中に、流入アンモニア濃度に対し 10~20%の硝酸が残存する。直接放流する場合には後段に従属微生物を用いる小型の脱窒槽を設ける必要があるが、有機物処理のための排水処理設備を有する場合には、有機物濃度が低くアンモニア濃度高い排水のみを選択的に本法で処理し、処理水を他の排水と混合する方法によって、効率的な窒素除去が可能であると考えられる。

本研究では、Anammox 微生物をグラニュール化することに成功し、高負荷型窒素除去システムとして上向流 Anammox グラニュールリアクターを開発した。実排水を用いたパイロット実験でその処理能力が検証され、リアクター容積負荷 6 kgN/m³/d 以上の高負荷が可能であることと、安定した処理が可能であることが示された。本法は前段に亜硝酸化プロセスが必要であるため、高濃度のアンモニアを含有する排水の処理に適していると考えられる。今後の Anammox プロセスの標準形となることが期待される。安定した亜硝酸化を継続するのが困難な低濃度の排水に対しては CANON 法が適しており、その種汚泥として Anammox グラニュールの利用が可能であることが示された。

謝辞

本論文は、著者が栗田工業株式会社研究開発本部在籍中に行った5年半の研究開発と、熊本大学大学院自然科学研究科環境共生科学専攻博士後期課程在学中の2年間の研究成果をまとめたものです。

本研究の遂行にあたり、研究開始当初からご指導を賜り、栗田工業在籍中に共同研究の研究者として1年間研究室に受入れて下さり、また博士課程在学中においても常に著者の事情を考慮しサポートして下さいました熊本大学工学部教授古川憲治先生に心より感謝申し上げます。

崇城大学応用生命科学科教授藤井隆夫先生のご尽力により、リアクター内の菌相解析を行うことができ、また折に触れ本研究に対する有意義なご討議を賜り、生物学的な観点からご助言を頂きました。

崇城大学の杉野浩幸先生（現富山福祉短期大学社会福祉学科社会福祉専攻助教授）には、菌相解析の実験でお世話になり、結果についてご討議頂きました。

熊本大学工学部助教授川越保徳先生には、実験や論文の執筆等様々な場面でご助言を頂きました。

博士課程において一緒に研究を行った熊本大学大学院の学生である河野洋平氏には、毎日通学できない著者に代わり実験装置のメンテナンスや分析をして頂きました。崇城大学の学生である井上剛志氏、島村宗孝氏、伊藤徳孝氏、山下和史氏には菌相解析の実験を行って頂きました。熊本大学古川研究室の学生の皆様には、快く受け入れて頂き、様々なイベントに誘って頂いて学生生活を楽しませて頂きました。

栗田工業在籍中にはたくさんの方々にお世話になりました。上司であった依田元之博士には、常に研究の方向性や方法についてアドバイス頂き、また精神面でもサポートして頂きました。本研究を博士論文としてまとめることを後押しして下さいましたことに心より感謝申し上げます。社会人になって初めての上司であった安井英斎博士には、研究報告書の書き方、実験装置の設計方法、研究計画の立て方など研究者としての基礎を教えて頂きました。同じ研究グループのメンバーで亜硝酸型硝化を担当されていた徳富孝明氏には、現場実験のノウハウをはじめ様々なことを相談させて頂き、アドバイスを頂きました。同じく研究グループの柴山千寿氏には実験室での人間関係などを教えて頂き、数少ない同性のメンバーとして一緒に時間を楽しく過ごさせて頂きました。清川智弘氏は著者の社内での研究を全て引継いで下さいました。他にも部内外のたくさんの方々の支えがあって本研究を行うことができました。

著者の研究を支えて下さった全ての方々に改めて厚く御礼を申し上げます。

最後に、博士課程入学のために生後4ヶ月から保育所通いをしてくれた息子の今城宏都くん、深い理解をもって常に支えてくれた夫の今城俊哉氏、応援してくれた愛する家族に心から感謝いたします。

平成18年3月

本論文に関する発表

論文

1. Imajo U., Ishida H., Hujii T., Sugino H., Rouse J.D. and Furukawa K. (2001) Detection of Anammox Activity from activated sludges, IWA, Asian Waterqual 2001 講演論文集, Vol.1, p.887-892.
2. Furukawa, K., Rouse, J.D., Imajo, U., Nakamura, K. and Ishida, H. (2002) Anaerobic oxidation of ammonium confirmed in continuous flow treatment using a non-woven biomass carrier, *Japanese journal of Water Treatment Biology*, **38**(2), 87-94.
第6回日本水処理生物学会学会論文賞受賞
3. Rouse, J.D., Yoshida, N., Hatanaka, H., Imajo, U. and Furukawa, K. (2003) Continuous treatment studies of anaerobic oxidation of ammonium using a nonwoven biomass carrier, *Jpn. J. Wat. Treat. Biol.*, **39**(1), 33-41.
4. 今城麗, 安井英斉, 石田浩昭, 藤井隆夫, 杉野浩幸, 古川憲治 (2004) 活性汚泥からの ANAMMOX 微生物の集積培養, *水環境学会誌*, Vol.27, No.6, p.413-418.
5. Imajo U., Tokutomi T. and Furukawa K. (2004) Granulation of Anammox microorganisms in up-flow reactors, *Water Science and Technology*, Vol.49, No.5-6, p.155-164.
6. 今城麗, 徳富孝明, 古川憲治 (2005) Anammox プロセスに適したリアクターの検討, *水環境学会誌*, Vol.28, No.3, p.185-190.
7. 今城麗, 河野洋平, 古川憲治 (2006) Anammox グラニュールを活用する単一槽窒素除去リアクターの立上げとその影響因子, *日本水処理生物学会誌*, Vol.42, No.1 掲載決定

学会発表

1. ANAMMOX 微生物の集積培養とその形態学的特徴
第36回水環境学会年会要旨集, p.78 (平成13年3月)
今城麗, 石田浩昭, 古川憲治, Rouse J.D.
2. Detection of Anammox Activity from activated sludges
IWA, Asian Waterqual 2001 講演論文集, 第1号, p.887-892 (平成13年9月)
Imajo U., Ishida H., Hujii T., Sugino H., Rouse J.D., Furukawa K.
3. ANAMMOX プロセスへの流動床リアクタの適用性
第36回水環境学会年会要旨集, p.385 (平成14年3月)
今城麗, 安井英斉, 古川憲治, Rouse J.D.
4. ANAMMOX 微生物のグラニュール化の検討
第37回水環境学会年会要旨集, p.404 (平成15年3月)
今城麗, 徳富孝明, 安井英斉, 古川憲治
5. Granulation of Anammox microorganisms in up-flow reactors
IWA 6th International Symposium on Strong Nitrogenous and Agro-Wastewater
Water Science and Technology, 49(5-6), 155-164, 2004
Best Paper of the Symposium 受賞 (平成15年6月)
Imajo U., Tokutomi T., Furukawa K.