

建設技術研究開発費補助金総合研究報告書

1. 課題番号 第18号
2. 研究課題名 ゼロエミッション・高資源回収型下水汚泥処理プロセスの開発
3. 研究期間 平成19年度～平成21年度
4. 代表者及び研究代表者、分担研究者

代表者	佐藤 久	北海道大学大学院工学研究院・准教授
研究代表者	佐藤 久	北海道大学大学院工学研究院・准教授
分担研究者	笠原 伸介	大阪工業大学 工学部・准教授
分担研究者	金田一 智規	広島大学大学院工学研究院・助教

5. 補助金交付総額 36,940,000 円

6. 研究・技術開発の目的

はじめに

湖沼や内湾などの閉鎖性水域の富栄養化は、生活、農業、工業排水に含まれる窒素やリンなどの栄養塩類の流入に起因する。富栄養化が進行すると、最終的には生態系のバランスが変化し、一般的には生物の多様性を減少する。また、それに伴い水質、景観の悪化、悪臭などの問題も発生する。このような富栄養化によって生じる様々な問題を解決するために、排水から窒素やリンを効率的に除去することが求められている。

現在、排水の窒素除去法として広く採用されている循環式硝化脱窒法などの手法では、硝化反応を行う硝化タンク、脱窒反応を行う脱窒タンクが必要であるため、広大な敷地面積と曝気のための大きなエネルギーが必要となる。このような問題を解決し得る嫌気性アンモニア酸化 (Anaerobic Ammonium Oxidation : 以下 ANAMMOX) 反応は、亜硝酸を電子受容体として、アンモニアを窒素ガスに酸化する反応 ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$) である。硝化脱窒による従来の窒素の代謝経路を大きく短縮することができるため、ANAMMOX 反応を行う ANAMMOX 細菌を排水中の窒素除去に適用することによって、コスト、エネルギーの大幅な削減が期待できる。一方で、ANAMMOX 細菌は生育速度が遅く (倍加時間が約 11 日)、リアクター内に安定して ANAMMOX 細菌を維持するのが困難であるという問題点を有している。さらに、リアクターに各種有機物質が流入することによって ANAMMOX 細菌の活性が低下し、処理性能が低下するという報告もされている。

ANAMMOX のように新規の細菌による処理法や、新規の処理方式について研究を行う場合、ラボスケールでのリアクターを運転し、設定した条件に応じた処理性能についてモニタリングを行うのが従来からの基本となっている。一方、近年では微生物の特性把握に遺伝子情報を直接解析する分子生物学的手法が用いられるようになった。分子生物学的手法の中には、微生物の同定や系統学的な分類を行う 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析や、同定あるいは群集の構造を解析する FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) 法、基質利用特性等の生理学的特性を解析する MAR-FISH (Microautoradiography-Fluorescence *In Situ* Hybridization) 法や SIP (Stable-Isotope Probing) 法など、数多くの手法がある。リアクターの処理性能のモニタリングに加えてこれらの分子生物学的手法を行うことにより、リアクターとしての特性だけでなく、さらに細部のリアクター内部における複合微生物群集の構造や機能、群集を構成する個々の微生物の基質利用特性を始めとする生理学的特性を把握することが可能となっている。

非常に高いポテンシャルを秘めている ANAMMOX プロセスの適用先として考えられる排水は低 C/N 比の排水であり、例えばメタン発酵脱離液などが挙げられるが、このメタン発酵脱離液中には少なからず有機物質が存在し、ANAMMOX プロセスへの適用を視野に入れると有機物質が ANAMMOX プロセスへ

及ぼす影響は無視できず，調査することは必要である．そこで以下のような項目について検討した．

① ANAMMOX プロセスを実際の排水処理に適用するにあたって，アンモニア性窒素から亜硝酸性窒素の生成を行う部分硝化プロセスを導入する必要がある．本研究では部分硝化リアクターの運転を行い，部分硝化－ANAMMOX プロセスを立ち上げることにより，部分硝化－ANAMMOX リアクターの処理性能を把握するとともに，後段の ANAMMOX 槽の微生物群集の構造が，前段の部分硝化槽で優占化すると考えられるアンモニア酸化細菌によってどのように変化するかを観察する．

② メタン発酵脱離液中に含まれる可能性の高い低級脂肪酸である酢酸及び酢酸に分子量の近いギ酸，プロピオン酸が ANAMMOX プロセスに対して及ぼす影響を異化・同化の両側面から解析する．

③ 実際にメタン発酵脱離液を通水し，ANAMMOX プロセスがどのような挙動を示すかを検討する．

(1) 固液分離機能を強化した高効率メタン発酵プロセスの開発

(1) 物理化学的制御を利用した余剰汚泥削減システムの開発

一般に、余剰汚泥の削減は、懸濁態の汚泥を物理化学的に可溶化しない限り達成されないと考えられていたが、本課題では、検討を進めていく中で、超音波処理や粉碎処理(ディスパーザー)といった微細化が主体となるプロセスでも十分な汚泥削減効果を発揮できることが明確となり、可溶化しないことが、むしろ処理水質の安定化にも寄与している可能性を認識するに至った。このことをふまえ、懸濁態成分の分解過程を考慮に入れた活性汚泥モデルを構築し、各種パラメータを実験的に推定することで、システムの合理設計手法を確立した。これにより、目標とする汚泥削減率を概ね達成するシステムの開発に成功した。

以下に、各検討に対する個別の成果を示す。

① 水熱反応＋生物分解システム(曝気槽返送型)の検討

人工排水を用いた回分実験および連続実験を行うとともに、活性汚泥モデルの改良と数値解析を行った結果、主に以下の成果が得られた。

- 1) 活性汚泥を可溶化するための水熱反応条件(温度, 時間, SS 濃度)を明確にした。
- 2) 水熱反応処理液を返送した活性汚泥処理システムにおける生物処理の操作条件を明確にした。
- 3) 生物反応槽内の動力学パラメータを明確にし、水熱反応処理液を返送した活性汚泥処理システムのモデルを構築した。
- 4) 構築したモデルを用いた数値解析結果は、実験結果と適合することを証明した。
- 5) 水熱反応処理液を返送した活性汚泥処理システムは、処理水 BOD 濃度を低下させることなく 90%以上の余剰汚泥削減率を達成できることを実証した。

② 超音波＋生物分解システム(曝気槽返送型)の検討

①と同様の手法で実験および解析を行った結果、主に以下の成果が得られた。

- 1) 活性汚泥を可溶化・微細化するための超音波照射条件(周波数, 時間, SS 濃度)を明確にした。
- 2) 超音波処理液を返送した活性汚泥処理システムにおける生物処理の操作条件を明確にした。
- 3) 生物反応槽内の動力学パラメータを明確にし、超音波処理液を返送した活性汚泥処理システムのモデルを構築した。
- 4) 構築したモデルを用いた数値解析結果は、実験結果と適合することを証明した。
- 5) 超音波処理液を返送した活性汚泥処理システムは、超音波プロセスにおいて 10%程度の可溶化率しか得られないにもかかわらず、処理水質を悪化させることなく 80%以上の余剰汚泥削減率を達成できることを実証した。

③ 破碎処理(ディスパーザー)＋生物分解システム(曝気槽返送型)の検討

②の検討において、低い可溶化率でも生物反応条件を適切に制御することによって高い汚泥削減率が得られたことをふまえ、より簡易な破碎処理を適用した場合の汚泥削減効果を検討した。①および②と同様の手法で実験および解析を行った結果、主に以下の成果が得られた。

- 1) 活性汚泥を微細化するための粉碎条件(回転数, 時間, SS 濃度)を明確にした。
- 2) 粉碎処理液を返送した活性汚泥処理システムにおける生物処理の操作条件を明確にした。
- 3) 生物反応槽内の動力学パラメータを明確にし、粉碎処理液を返送した活性汚泥処理システムのモデルを構築した。
- 4) 構築したモデルを用いた数値解析結果は、実験結果と適合することを証明した。
- 5) SS 可溶化 10%以下の粉碎処理を適用しても、生物反応槽を低負荷で操作することにより 70%以上の余剰汚泥削減率を達成できることを示した。

④ 汚泥貯留槽型システムの検討

当初より開発の主体であった「曝気槽返送型」の汚泥削減システムは、方式としては合理的である。しかし、実用化を考えると、新規に施設を建設する場合はともかく、既存の施設に適用する場合には大規模な施設改修が必要となるうえ、処理水質の慎重な管理が不可欠となる。このような連携企業からの指摘を受け、既存の施設を利用でき、且つ、比較的容易に処理水質を管理し得る「汚泥貯留槽型」の汚泥削減システムの開発に着手した。

人工排水を用いた連続実験を行うとともに、活性汚泥モデルの改良と数値解析を行った結果、主に以下の成果が得られた。

- 1) 無酸素槽と好気槽から成る二槽循環式余剰汚泥削減システムの処理フローを構築し、循環量、

容積負荷などの操作条件を整理した。

- 2) 生物反応槽内の動力学パラメータを明確にし、二槽循環式余剰汚泥削減システムのモデルを構築した。
- 3) 構築したモデルを用いた数値解析結果は、実験結果と適合することを証明した。

(2) 微生物を利用した余剰汚泥削減システムの開発

① 多段式曝気槽とスポンジ担体を用いた活性汚泥法

担体を投入した曝気槽を多段に仕切り、後段の処理液を曝気槽前段へ返送することにより余剰汚泥を削減する技術は、連携企業を含めて一部で実用化されている。これは、前段の高負荷と後段の低負荷の組み合わせ、担体への有用細菌・微生物によるものと考えられるが、はっきりとしたことはわかっていない。そのため、ラボスケールでその現象を再現するとともにその機構解明のための実験を行った結果、主に以下の成果が得られた。

- 1) 後段からの処理液の返送量を大きくすることにより、汚泥が減少する傾向が得られた。

担体には後生動物が多く存在していることが確認され、その結果汚泥の生成量が抑制されていることが示唆された。

(2) ジルコニウム系新規リン酸吸着剤(ZS)の下水汚泥消化液への適用

はじめに

リンはあらゆる生物にとって必須の元素であり、食料生産にも欠くことができない貴重な資源である。にもかかわらず、近年、リン資源の枯渇化が懸念されている。例えば、現在の技術で経済的に採掘可能なリン鉱石は、今後約 50 年分しかなく、採掘コストが高い地下資源を含めても 100 年ほどで枯渇すると予測されている¹⁾。

わが国は年間約 100 万トンものリン鉱石を総て海外から輸入している、世界有数のリン輸入国である²⁾。リン鉱石のリンの約 80%は化学肥料に使われており、数%が家畜飼料添加用、残りの 10 数%が界面活性剤や金属処理などに使われている³⁾。我が国のリン資源を確保するため、使用後のリンを回収し、再利用することが求められている。

農産物中に取り込まれたリンは、人体や家畜などを經由して、最終的には排水に移行する。未処理の排水が水環境中に流出すると富栄養化を引き起こす。リンは生物学および物理化学的に水中から除去可能であり、除去されたリンは汚泥に移行する。従って、水処理プロセスで発生した汚泥はリン資源とみなすことができる。リンを蓄積した汚泥には、濃縮・脱水工程でリンが再溶出する、再溶出したリンが不溶性のマグネシウムアンモニウム塩(MAP)を形成し、配管等を詰まらせる、焼却汚泥のセメント原料としての価値を低減させる、等の問題を引き起こすため、これらの点からも汚泥からのリン除去は必要不可欠である³⁾。

下水汚泥からリンを溶出させる方法として、嫌気性消化、加熱処理、フォストリップ、オゾン+アルカリ処理などの方法がある。溶出したリンを回収する方法として、MAP やヒドロキシアパタイト(HAP)として液中から晶析する方法が実用化されている。しかしながらこれらの方法では、Ca イオン、Mg イオン、アルカリを添加する必要があり、新たに脱リン槽を用意しなければいけない。これに対し我々の研究グループでは、ジルコニウム硫酸イオン-界面活性剤ミセルメゾ構造体(ZS)という、新規のリン酸(PO_4^{3-})吸着剤を開発し、溶液からのリン回収を試みている。本発表では、ZS の吸着能、脱着能について報告する。

実験方法

ZS は、硫酸ジルコニウム四水和物(添川理化学株式会社)とヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド(東京化成)を用いて合成した。回分試験により、ZS の PO_4^{3-} 吸着量および脱着量を検討した。1,000 mg- PO_4^{3-} /L の PO_4^{3-} 溶液 200 mL, ZS 1 g をビーカーに入れ 2 時間攪拌した。2 時間後、 PO_4^{3-} を測定した。孔径 0.45 μm のフィルターを用いて溶液から ZS を分離し、200 mL の蒸留水で洗浄した後、フィルターを用いて ZS を回収した。pH 13.5 の水酸化ナトリウム溶液 50 mL をビーカーに入れ、洗浄した PO_4^{3-} 吸着後の ZS を加え、1 時間攪拌した。1 時間後、 PO_4^{3-} を測定した。 PO_4^{3-} はモリブデン青法で測定した。

結果および考察

まず、 PO_4^{3-} 溶液(蒸留水に PO_4^{3-} を添加したもの)を用いて吸着剤の性能を検討した。得られた吸着等温線を Langmuir 式で近似した結果、飽和吸着量は 370 mg- PO_4^{3-} /g であった。これは既存の吸着剤よりも高い値であった。 PO_4^{3-} 吸着後の ZS から PO_4^{3-} を脱着させた。pH 11 から 13.5 までの間では、pH の上昇に伴い PO_4^{3-} 吸着率は増大した。pH 13.5 以上の条件下では脱着率は 85%と一定であった。

次に都市下水を凝集沈殿処理した後に発生した汚泥から得た PO_4^{3-} 実溶液を用いて吸着剤の性能を評価した。実溶液は下水汚泥をクエン酸で処理することで得た。実溶液の PO_4^{3-} 濃度は、クエン酸溶液の添加量によって、250~1,000 mg- PO_4^{3-} /L の間で変化した。実溶液を用いて吸着剤の性能を検討した。得られた吸着等温線を Langmuir 式で近似した結果、飽和吸着量は 370 mg- PO_4^{3-} /g と PO_4^{3-} 溶液に対する値と変わらなかった。しかしながら、実溶液の PO_4^{3-} 濃度が 400 mg- PO_4^{3-} /L 以下の条件における吸着量は、 PO_4^{3-} 溶液のそれに比べて低かった。

結論

本研究では新規リン酸吸着剤を開発した。この吸着剤は既存の吸着剤に比べて飽和吸着量が高かった。今後は本吸着剤を包括固定し、繰り返し利用するプロセスを構築する。

参考文献

Abelson et al., 1999. *Science*, 283, p2015.

松八重ら, 2008. 元素資源の濃縮と活用のエンジニアリング SORST シンポジウム, p3.

黒田ら, 2005. 環境バイオテクノロジー学会誌, 4, p87-94.

(3) 超高速型アナモックスリアクターの安定化技術の開発

① 亜硝酸型硝化—ANAMMOX プロセスの運転及び解析

1) 亜硝酸型硝化リアクターの運転

ANAMMOX プロセスを実際の排水処理に導入するにあたって、前段にアンモニア性窒素から亜硝酸性窒素の生成を行う部分硝化プロセスを組み合わせることが必要となる。部分硝化リアクターに影響を与える要因として挙げられるのは pH, 温度, 溶存酸素濃度, 遊離アンモニア濃度である。本節では、下水処理場の返送汚泥を植種源として部分硝化リアクターを立ち上げ、溶存酸素濃度, HRT を中心にリアクター運転の最適条件の探索, アンモニア酸化・亜硝酸生成性能の把握, FISH 法による菌相の解析を行い, ANAMMOX リアクターに接続可能な性能 (流出のアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素の比が 1 : 1) を維持することを目指した。

リアクターの概要

本研究で用いた部分硝化リアクターの概要を図 3.1 に示す。ガラス製のバイオカラムを用いて up-flow 式の生物膜リアクターとし、上層・中層・下層に生物膜のサンプリングポートを設けた改造カラムを用いた。生物膜担体には不織布を使用し、植種源には東広島浄化センターの返送汚泥を用いた。送液ポンプで人工排水を連続的に供給した。さらに、エアポンプを用いて曝気を行い、流量計を用いて曝気量をコントロールした。

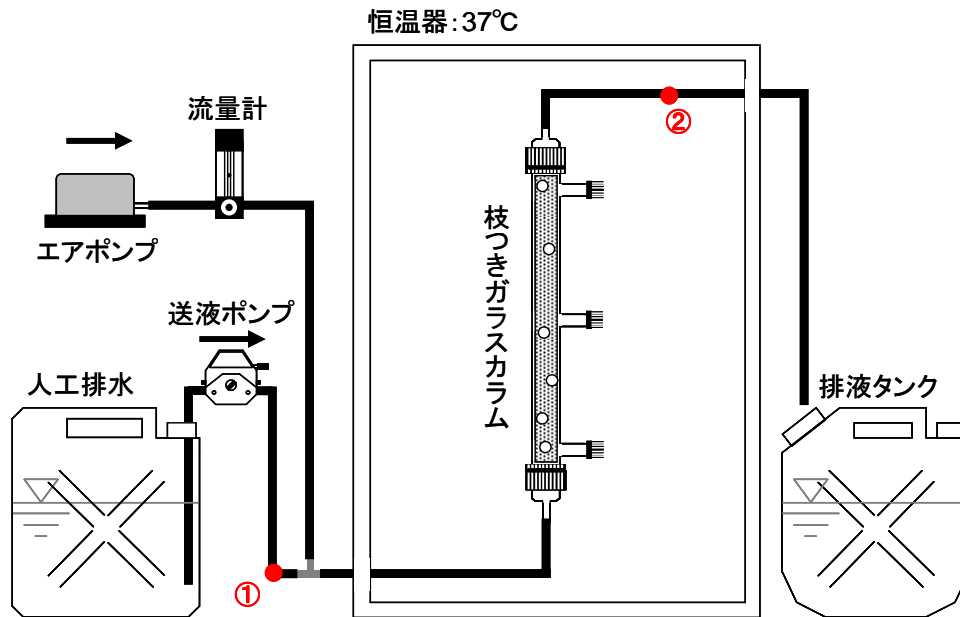


図 3.1 部分硝化リアクターの概要

運転条件

改造カラムは内径 3 cm, 長さ 41 cm, 断面積 7.1 cm², 容積 250 mL のもの, 生物膜担体は 3×41 = 123 cm² の不織布を用いた。運転温度は 37°C とした。表 3.1 に部分硝化リアクターに流入させた人工排水の組成を示す。唯一の窒素源をアンモニア性窒素とし, その濃度は運転開始時から一定の 318 mgN L⁻¹ とした。植種源の返送汚泥を純水で約 3 倍希釈したものに不織布を浸し, カラムにセットして人工排水を流入させて運転をスタートした。運転期間の初期は炭素源あるいは pH バッファーとして炭酸水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウムを用いたが, 運転上の都合から後期より炭酸水素ナトリウムと炭酸水素カリウムを用いた。運転期間中は終始 pH = 8 付近になるように pH バッファー濃度を設定した。運転開始時の HRT は約 1.6

時間であり, HRT をコントロールすることによって流入窒素負荷を変化させた. また, 流量計により曝気量を変化させることによってアンモニア酸化量を調整した.

表 3.1 人工排水の組成

基質	濃度 (mg/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1500
NaHCO_3	1000 → 1150
KHCO_3	0 → 500 → 650
Na_2HPO_4	400 → 0
KH_2PO_4	27.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	180
TE I	
EDTA · 2Na	0.005
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.009
EDTA · 2Na	0.015
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.00025
Na_2SeO_4	0.00011
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00019
TE II	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00024
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00022
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.00099
H_3BO_4	0.000014
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.00043

水質の測定

図 3.1 の①, ②をサンプリング地点としてリアクターの流入・流出の水質を測定した. 測定項目は各態窒素濃度, pH とし, ②において流量を測定した. 各態窒素濃度はイオンクロマトグラフを用いて測定した.

各態窒素濃度と流量をもとに算出した HRT より流入窒素負荷, アンモニア酸化速度, 亜硝酸生成速度を以下に示す式 (3.1)~(3.3) で求めた.

・流入窒素負荷 L ($\text{kgTN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$)

$$L = \frac{[\text{TN}]_{\text{in}}}{\theta} \quad (3.1)$$

・アンモニア酸化速度 $R_{\text{NH}_4^+}$

$$R_{\text{NH}_4^+} = \frac{[\text{NH}_4^+ - \text{N}]_{\text{in}} - [\text{NH}_4^+ - \text{N}]_{\text{out}}}{\theta} \quad (3.2)$$

・亜硝酸生成速度 $R_{\text{NO}_2^-}$

$$R_{\text{NO}_2^-} = \frac{[\text{NO}_2^- - \text{N}]_{\text{out}} - [\text{NO}_2^- - \text{N}]_{\text{in}}}{\theta} \quad (3.3)$$

[]: 濃度 (kgN m^{-3})

θ : 水理的滞留時間 HRT (day) = カラム容量 (mL) / 流量 (mL day^{-1})

また, 流入のアンモニア性窒素のうち酸化されたアンモニアの割合を示すアンモニア酸化率を以下の式 (3.4) に示す.

・アンモニア酸化率 $E_{\text{NH}_4^+}$

$$E_{\text{NH}_4^+} = \frac{[\text{NH}_4^+ - \text{N}]_{\text{in}} - [\text{NH}_4^+ - \text{N}]_{\text{out}}}{[\text{NH}_4^+ - \text{N}]_{\text{in}}} \times 100 \quad (3.4)$$

部分硝化における亜硝酸の生成は遊離アンモニア (NH_3) 濃度によって左右される. 流入・流出における遊離アンモニア濃度は, pH, 運転温度によって以下の式(3.5)によって算出した.

・遊離アンモニア (FA) 濃度 (mg L^{-1})

$$\text{FA}_{\text{in,out}} = \frac{17}{14} \times \frac{[\text{NH}_4^+ - \text{N}]_{\text{in,out}} \times 10^{\text{pH}_{\text{in,out}}}}{e^{6344/(273+T)} + 10^{\text{pH}_{\text{in,out}}}} \quad (3.5)$$

[]: 濃度 (mgN L^{-1})

T: 運転温度 ($^{\circ}\text{C}$)

アンモニア酸化・亜硝酸生成性能の経日変化

部分硝化リアクターの運転は、その処理性能を把握しながら表 3.2 に示すような段階に分けて運転を行った。図 3.2 にリアクター流入・流出の各態窒素濃度の経日変化、図 3.3 にアンモニア酸化速度、亜硝酸生成速度、流入アンモニア負荷の経日変化を示す。

表 3.2 各 phase と運転条件

	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5	Phase 6	Phase 7	Phase 8
期間 (日)	0~50	50~79	79~113	113~129	129~141	141~185	185~195	195~238
HRT (h)	1.7 ± 0.2	2.5 ± 1.5	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1
曝気量 (mL min^{-1})	50	100	100	150	200	100	100	150

phase 7からは人工排水の組成を変更

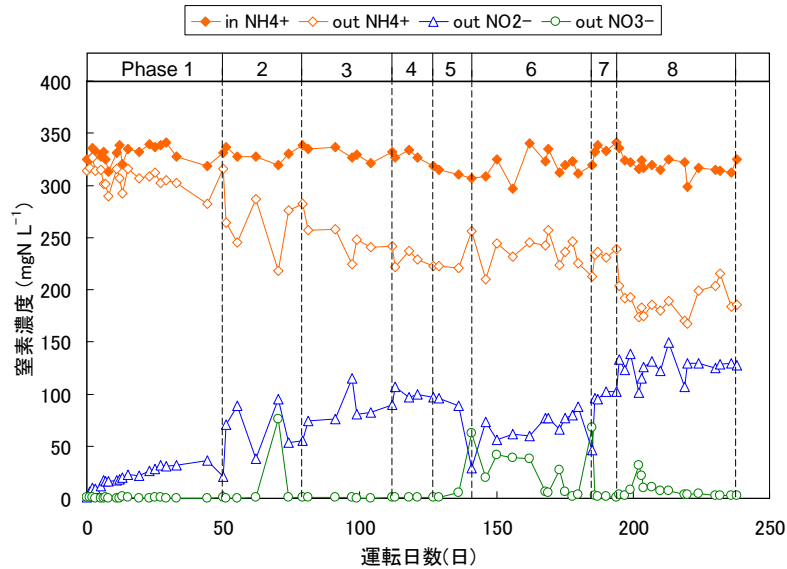


図 3.2 流入・流出における各態窒素濃度の変化

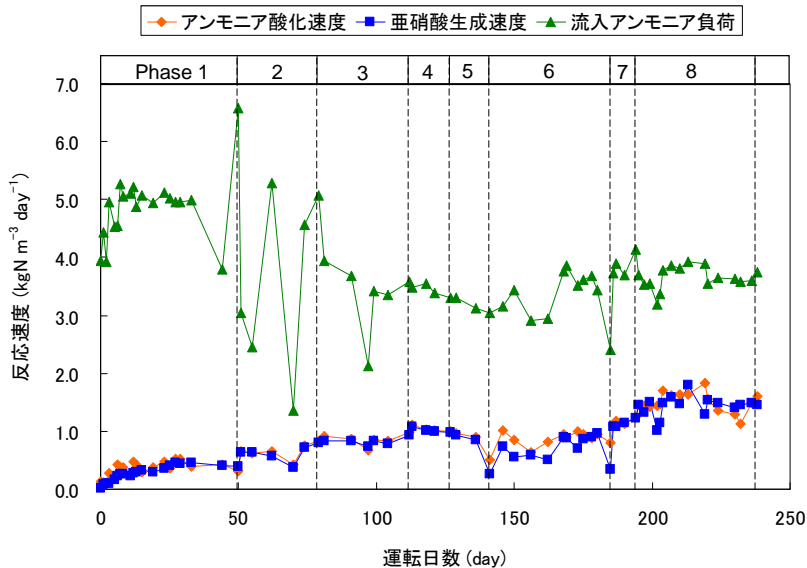


図 3.3 アンモニア酸化速度、亜硝酸生成速度、流入アンモニア負荷の変化

Phase 1 では曝気量を 50 mL min^{-1} に設定し、流入窒素負荷が $5 \text{ kgTN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ になるように運転を行った。運転開始した翌日の測定より、 6.3 mgN L^{-1} の亜硝酸性窒素の生成が見られた。亜硝酸性窒素の生成量も多くなり (約 30 mgN L^{-1})、30 日前後でアンモニア酸化速度・亜硝酸生成速度が安定した (それぞれ約 $0.5, 0.4 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 程度)。44 日目と 50 日目に送液ポンプの不具合が生じたため、流入アンモニア負荷が大きく変動した。

Phase 2 では曝気量を 100 mL min^{-1} に増加させたが、引き続き送液ポンプによる人工排水の流量が安定せず、流入窒素負荷が不安定であった。HRT が 5.6 時間にまで増加した際に、亜硝酸の生成が多くなるとともに、 75.7 mgN L^{-1} もの硝酸の生成が観察された。HRT が極端に増加することによって硝酸が生成される傾向にある。

Phase 3 では引き続き曝気量を 100 mL min^{-1} に設定し、安定した HRT で運転を行った。HRT を 2.2 時間にまで増加させたところ、Phase 1 と比較して流出のアンモニア性窒素の減少・亜硝酸性窒素濃度の増加が見られ、それに伴いアンモニア酸化速度・亜硝酸生成速度の増加が見られた。Phase 3 における流出の亜硝酸性窒素濃度の最大値は、 89.5 mgN L^{-1} であり、そのときのアンモニア酸化速度・亜硝酸生成速度はそれぞれ $0.98, 0.93 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ であった。

Phase 4 で曝気量を 150 mL min^{-1} に増加させたところ、わずかではあるがアンモニア酸化・亜硝酸生成が促進された。流出における亜硝酸性窒素濃度の最大値は 99.3 mgN L^{-1} 、そのときのアンモニア酸化速度・亜硝酸生成速度はそれぞれ $1.02, 1.00 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ であった。

Phase 5 でさらに曝気量を増加させて 200 mL min^{-1} に設定したところ、12 日目 (運転開始から 141 日目) で 62.5 mgN L^{-1} もの硝酸の生成が観察され、その際に流出の亜硝酸性窒素濃度が 28.9 mgN L^{-1} にまで減少した。これは曝気量の増加によってカラム内の DO 濃度が増加し、亜硝酸酸化細菌による硝化反応が促進されたものによると考えられる。これはアンモニア酸化速度と亜硝酸生成速度の間に差異 (それぞれ $0.51, 0.26 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) が見られたことからそうであると考えられる。

そのため、Phase 6 では亜硝酸酸化細菌の活性を低下させるために HRT を維持したままで曝気量を 100 mL min^{-1} に抑えて運転を行った。それにより、徐々に流出の硝酸性窒素濃度が減少するとともに亜硝酸性窒素濃度の増加が観察されたが、流出の硝酸が通常のレベルに減少するまでに 21 日間を要した。Phase 6 の最後に再び HRT が上昇し、硝酸が発生したが、これも送液ポンプの不具合が生じたためである。そもそも送液ポンプの不具合は、人工排水中に pH バッファーとして含まれていたリン酸水素二ナトリウムが析出し、送液ポンプ内の流路が詰まることによって生じていたため、次 Phase からはリン酸水素二ナトリウムを含まない人工排水を用いることにした。

Phase 7 からは人工排水中のリン酸水素二ナトリウムをゼロにし、その代わりに炭酸水素ナトリウムの濃度を上げ、さらに炭酸水素カリウムを加えることで、流入の pH = 8 付近を維持した。これにより流路の詰まりは見られなくなり、リアクターの性能についてもアップした (流出の亜硝酸性窒素濃度が最大で 102.4 mgN L^{-1})。

Phase 8 では HRT を維持したまま曝気量を 150 mL min^{-1} に増加させて運転を行ったところ、アンモニア酸化と亜硝酸生成が増進した。最終的にはアンモニア酸化速度・亜硝酸生成速度をそれぞれ $1.3, 1.5 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 程度に、流出の亜硝酸性窒素濃度を 120 mgN L^{-1} 程度に維持した。最終的には流出中のアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素濃度の比は 3 : 2 程度となった。

表 3.3 に様々な方式での部分硝化リアクターの性能についての既往の報告との比較を示す。本章で運転したリアクターの Phase 8 における亜硝酸生成速度は約 $1.5 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ であったため、既往の報告と比較しておおよそ 3 倍程度の亜硝酸生成性能を有していると言える。アンモニア酸化率の経時変化については図 3.4 に示す。

表 3.3 各種部分硝化リアクターの性能の既往の報告との比較

Reactor	Substrate	Influent $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg L^{-1})	Nitrification rate ($\text{kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$)	Ammonia Oxidation Rate (%)	HRT (day)	Reference
連続攪拌	脱離液	1176	0.58	53	-	5.2
連続攪拌	し尿	7300	0.78	47	-	5.3
連続バッチ	し尿	2240	0.28	51	-	5.3
連続攪拌	脱離液	417±14	0.30-0.38	45.4-64.3	-	5.4
SHARON	人工排水	500-1000	0.40-0.50	42-60	1.1	5.5
SHARON	消化液	1000	0.30-0.48	30-40	1	5.5
生物膜	人工排水	800-1000	0.24-1.37	49	-	5.6
生物膜	脱離液	660±50	0.74	53	-	5.6
生物膜	脱離液	610±20	0.62	49	-	5.6
生物膜	人工排水	320	1.5	43	-	this study

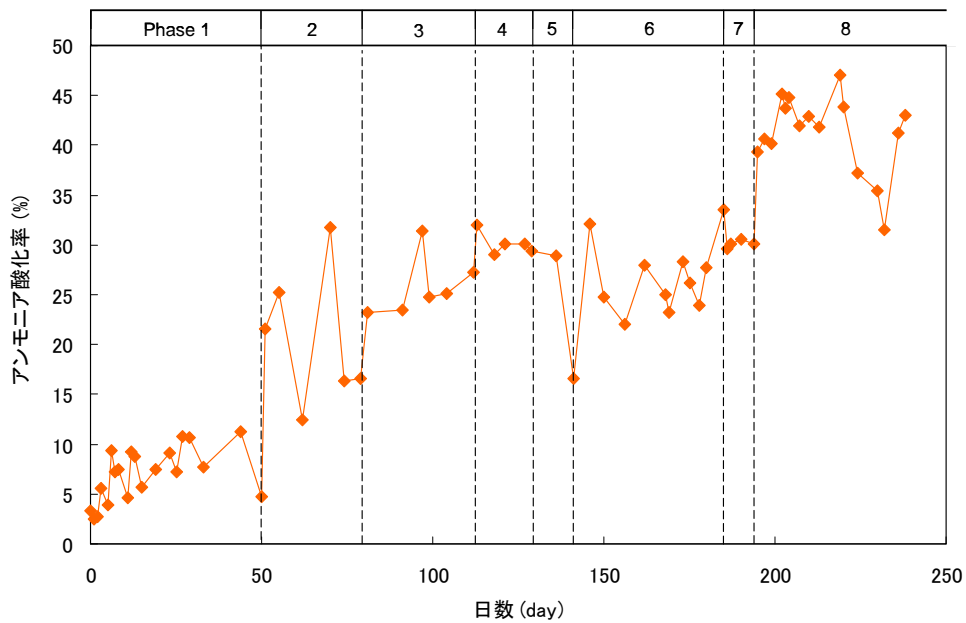


図 3.4 アンモニア酸化率の経時変化

また、図 3.5 に示すとおり、リアクターの性能の向上に伴って生物膜の変化が観察された。アンモニア酸化速度が増加するとともに生物膜の色が薄い黄色、薄いオレンジへと変化した。

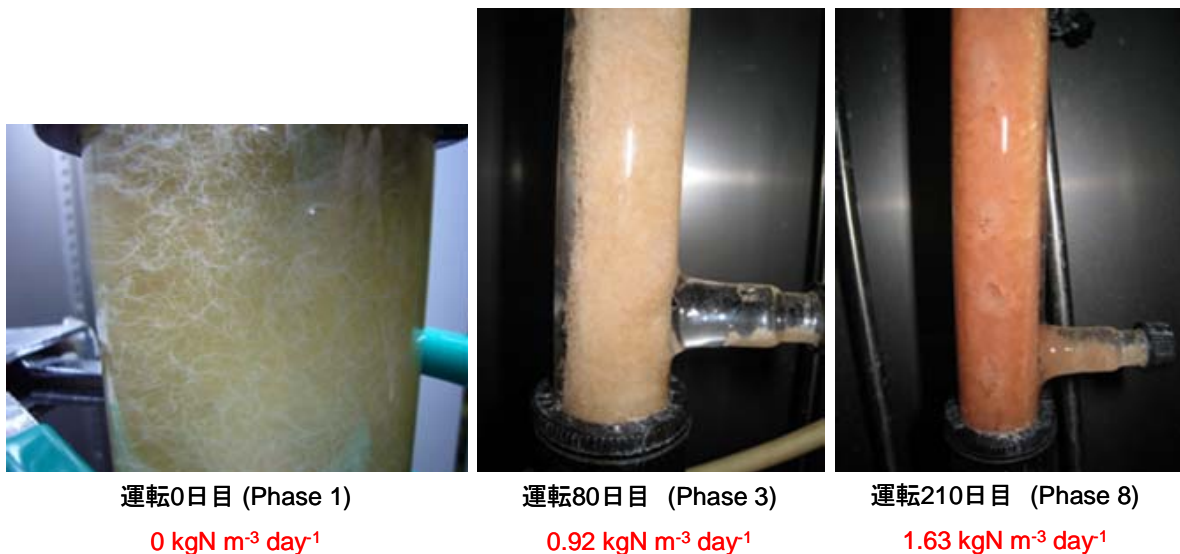


図 3.5 生物膜の変化 (赤字はアンモニア酸化速度)

FISH 法による細菌群集構造の把握

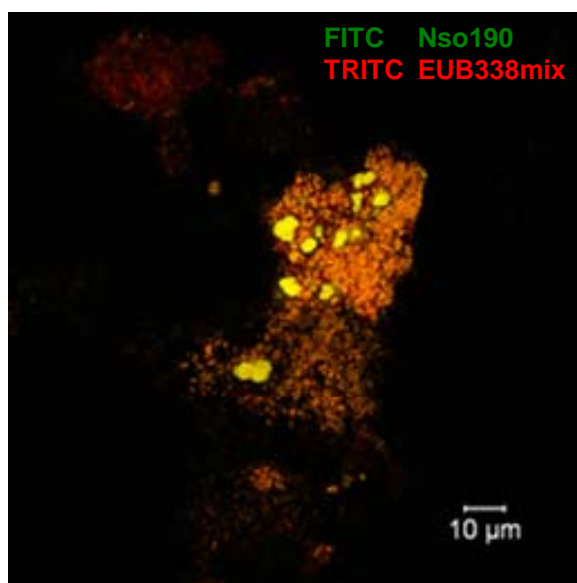
生物膜にアンモニア酸化細菌がどの程度優占化しているか、あるいは亜硝酸酸化細菌がどの程度存在しているかを把握するために FISH 法による顕微鏡観察を行った。用いたプローブを表 3.4 に示す。本節では、FISH 法による細菌の定量を行うために、顕微鏡画像上で細菌の構成比を求めた。構成比の算出方法として、顕微鏡観察によって得られた画像中に、対象とした細菌の蛍光面積がどの程度含まれているかという面積定量によって細菌の構成比を求めた。構成比を求める際は、ランダムに 10 回撮影を行った後、それぞれの画像での細菌の構成比を平均した。

表 3.4 本節で用いたプローブ

Probe	Sequence (5' to 3')	FA (%)	Specificity	Reference
EUB338	gct gcc tcc cgt agg agt	0-50	Most bacteria	5.7
EUB338II	gca gcc acc cgt agg tgt	0-50	Planctomycetales	5.8
EUB338III	gct gcc acc cgt agg tgt	0-50	Verrucomicrobiales	5.8
Nso190	cga tcc cct gct ttt ctc c	35	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria	5.9
NIT3	cct gtg ctc cat gct ccg	40	Nitrobacter spp.	5.10
Ntspa662	gga att ccg cgc tcc tct	35	genus Nitrospira	5.11
GNSB-941	aaa cca cac gct ccg ct	35	Chloflexi	5.12
Comp* for NIT3	cct gtg ctc cag gct ccg	40	—	5.10
Comp* for Ntspa662	gga att ccg ctc tcc tct	35	—	5.11

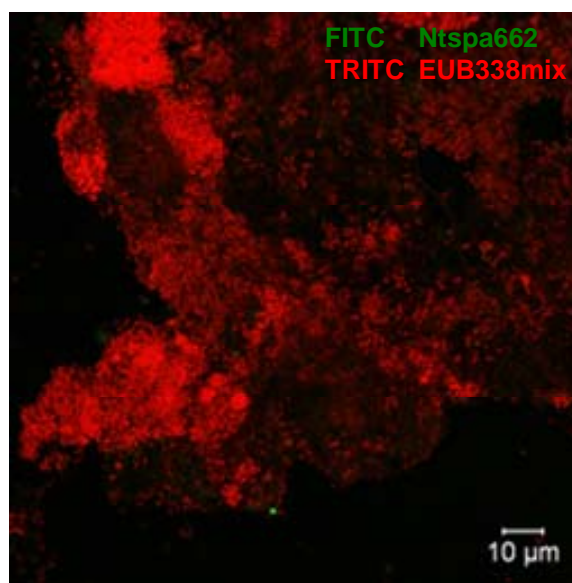
*Competitor (Unlabeled probe)

Phase 8 のリアクターの生物膜サンプルに対して FISH 法を行い、得られた画像を画像 3.1, 3.2 に示す。



画像 3.1 FISH 画像
(Betaproteobacterial AOB)

Nso190/EUB338mix による構成比 71.7%



画像 3.2 FISH 画像
(Nitrospira 属)

Ntspa662/EUB338mix による構成比 0%

画像 3.1 は *Betaproteobacteria* 綱に属するアンモニア酸化細菌を対象とする Nso190 と全細菌を対象とする EUB338mix のプローブを用いた FISH 画像である。画像中央の濃い黄色とその周辺の山吹色で染色されたのがアンモニア酸化細菌を示す。なお、アンモニア酸化細菌を蛍光標識する Nso190 と全細菌を蛍光標識する EUB338mix の顕微鏡画像中の蛍光面積を用いて、Nso190/EUB338mix より全細菌に対するアンモニア酸化細菌の構成比を求めたところ、その値は 76.1% (n=10, 標準偏差 4.0) であった。部分硝化リアクター内の生物膜にはアンモニア酸化細菌が高濃度に集積されていたと言える。

画像 3.2 は亜硝酸酸化細菌の一種である *Nitrospira* 属に属する細菌を対象とする Ntspa662 と

EUB338mix のプローブを用いた FISH 画像である。この画像から、*Nitrospira* 属の細菌は存在しないことがわかる。また、*Alphaproteobacteria* 綱の亜硝酸酸化細菌である *Nitrobacter* 属を対象とするプローブ NIT3 についても同様に蛍光シグナルが得られず、生物膜に存在していることが確認されなかった。

これらのことから、部分硝化リアクターの生物膜にはアンモニア酸化細菌が高濃度に集積していることがわかった。また、このことと図 3.5 より、アンモニア酸化細菌が集積した生物膜は薄いオレンジ色を呈することが確認された。

- 部分硝化リアクターの運転で、既往の研究の 3 倍程度の亜硝酸生成速度 (約 $1.5 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) を達成し、アンモニア性窒素濃度と亜硝酸性窒素濃度の比が約 3 : 2 の処理水を得ることができた。
- FISH 法の結果、部分硝化リアクターの生物膜にはアンモニア酸化細菌が高濃度に集積されていたことが示された (FISH 法による構成比で約 76.1%)。
- アンモニア酸化細菌が集積した生物膜は薄いオレンジ色を呈することが確認された。

2) 亜硝酸型硝化—ANAMMOX プロセスの運転

亜硝酸型硝化を行う部分硝化リアクターを運転し、アンモニア性窒素と亜硝酸性窒素の濃度比が 3 : 2 程度の処理水を得ることができた。前段に部分硝化リアクター、後段に ANAMMOX リアクターを繋げた部分硝化—ANAMMOX プロセスを運転し、処理性能の把握と、前段に部分硝化リアクターを接続したことによる ANAMMOX リアクターの生物膜の菌相の変化を把握するため FISH 法を行った。

リアクターの概要

部分硝化—ANAMMOX リアクターの概要を図 3.6 に示す。ガラス製の部分硝化リアクターを用いて、新しく作成した ANAMMOX リアクターを沈殿槽の前後に設置した。沈殿槽では、曝気を行っている部分硝化リアクターからの空気と処理水の分離、部分硝化リアクターから流出するバイオマスと処理水の分離、処理水中の DO 濃度の低下の役割を担っている。部分硝化槽と ANAMMOX 槽の容積は各 250 mL、沈殿槽の有効容積は 400~500 mL とした。

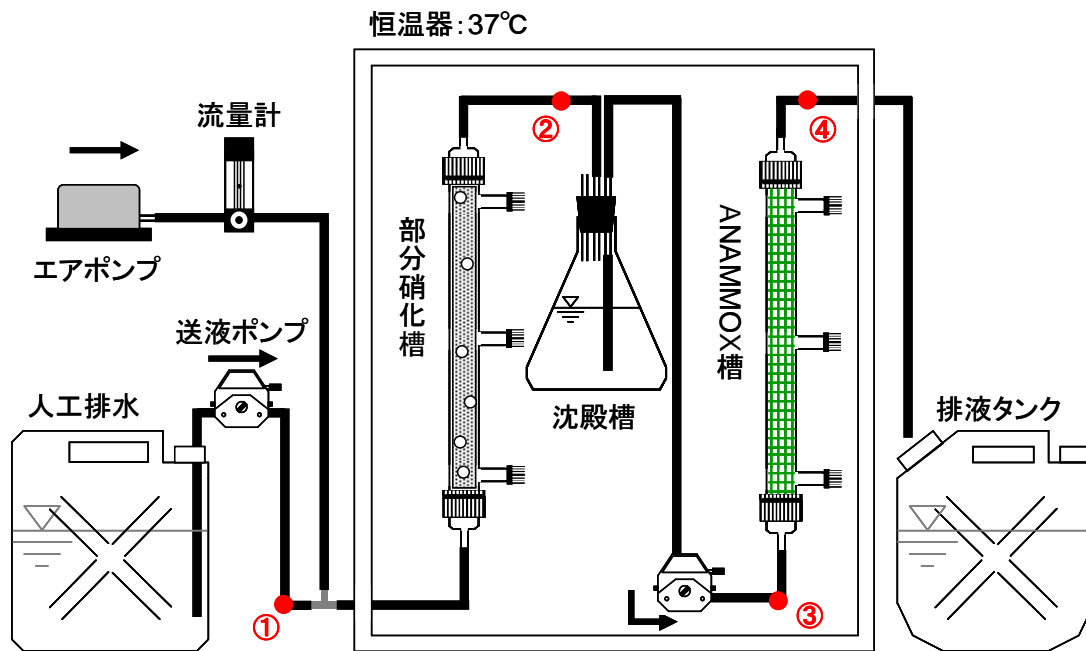


図 3.6 部分硝化—ANAMMOX リアクターの概要

安定段階 ANAMMOX 槽の運転条件

部分硝化－ANAMMOXリアクターの運転に先立って新規に ANAMMOX 槽を立ち上げ、性能を安定させた。表 3.5 に安定段階の ANAMMOX 槽に用いた人工排水の組成を示す。

表 3.5 安定段階時の ANAMMOX 槽の人工排水の組成

基質		濃度(mg/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄		650 – 1000
NaNO ₂		600 – 950
KHCO ₃		100
NaHCO ₃		400
KH ₂ PO ₄		27.2
MgSO ₄ ・7H ₂ O		300
CaCl ₂ ・2H ₂ O		180
TE I	EDTA・2Na	5
	FeSO ₄ ・7H ₂ O	9
TE II	EDTA・2Na	15
	CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.25
	Na ₂ SeO ₄	0.11
	NiCl ₂ ・6H ₂ O	0.19
	CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.24
	NaMoO ₄ ・2H ₂ O	0.22
	MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.99
	H ₃ BO ₄	0.014
	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.43

部分硝化－ANAMMOX リアクターの運転条件

ANAMMOX 槽については部分硝化槽と同様のガラス製のバイオカラムを用い、生物膜担体として園芸用ネットを用いた。リアクターの容積は、部分硝化槽と ANAMMOX 槽の容積を足し合わせて 500 mL とした。運転温度は 37°C とし、曝気量は 150 mL min⁻¹ とした。表 3.6 に流入させた人工排水の組成を示す。微量元素については表 3.5 と同じ組成を用いた。

表 3.6 部分硝化－ANAMMOX リアクターの人工排水の組成

基質		濃度 (mg/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄		1500
NaHCO ₃		1150
KHCO ₃		650
KH ₂ PO ₄		27.2
MgSO ₄ ・7H ₂ O		300
CaCl ₂ ・2H ₂ O		180
TE I	EDTA・2Na	0.005
	FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.009
TE II	EDTA・2Na	0.015
	CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.00025
	Na ₂ SeO ₄	0.00011
	NiCl ₂ ・6H ₂ O	0.00019
	CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.00024
	NaMoO ₄ ・2H ₂ O	0.00022
	MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.00099
	H ₃ BO ₄	0.000014
	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.00043

水質の測定

図 3.6 の①, ②, ③, ④をそれぞれ部分硝化槽流入・流出, ANAMMOX 槽流入・流出のサンプリング地点としてサンプリングを行い、水質を測定した。測定項目は各態窒素濃度, pH とし、②と④において部分

硝化槽とANAMMOX槽の流量を測定した。なお、部分硝化槽とANAMMOX槽の流量は同じであるが、同じ流量であることの確認のための測定とした。各態窒素濃度と流量をもとに算出したHRTより流入窒素負荷、窒素除去速度、窒素除去率を式(3.1)~(3.4)で求めた。

安定段階 ANAMMOX 槽の窒素除去性能の経日変化

安定段階時のANAMMOX槽の窒素除去性能の経日変化を示す。図3.7に流入・流出の各態窒素濃度の経日変化、図3.8に窒素除去率の経日変化、図3.9に流入窒素負荷・窒素除去速度の経日変化を示す。

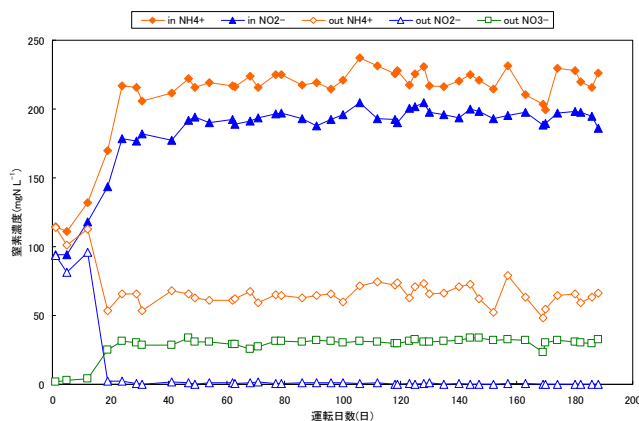


図 3.7 流入・流出における各態窒素濃度の経日変化

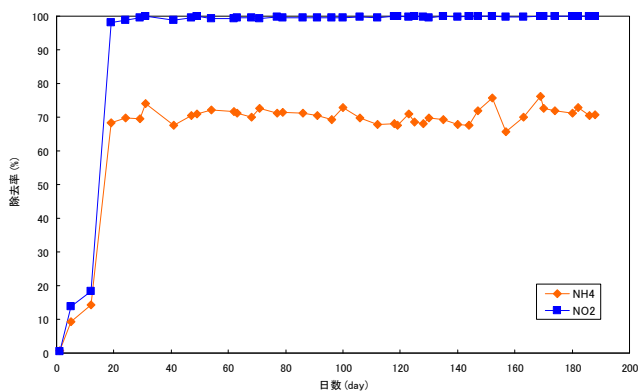


図 3.8 窒素除去率の経日変化

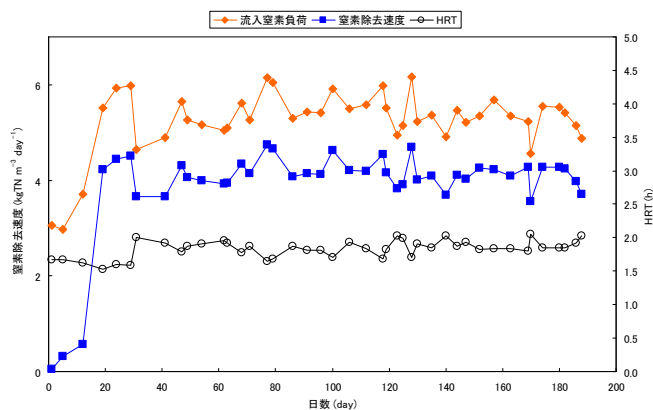


図 3.9 流入窒素負荷・窒素除去速度の経日変化

本章で用いた ANAMMOX リアクターでは植種源の ANAMMOX 汚泥を多く用いたため、図 3.8 に示すとおり、運転開始から 19 日目で既に 100% 近くの窒素除去率が得られた。窒素除去率が 100% 近くに達するまでは流入のアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素の濃度を段階的に上昇させ、その後の濃度は一定とし、流入窒素負荷を $5 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 付近を保った。HRT については運転開始時から 2 時間を維持した。その結果、アンモニア性窒素除去率は 100% 付近、亜硝酸性窒素除去率は 70% 付近、窒素除去速度は $4 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 付近を維持した。

部分硝化－ANAMMOX リアクターの窒素除去性能の経日変化

部分硝化リアクターと ANAMMOX 槽を図 3.6 のように沈殿槽を挟んで接続して約 1 ヶ月間運転し、水質のモニタリングを行った。図 3.10 に部分硝化－ANAMMOX リアクターの流入 (サンプリング地点:①), 流出 (サンプリング地点:④) の各態窒素濃度の経日変化, 図 3.11 に流入窒素負荷, 窒素除去速度の経日変化を示す。

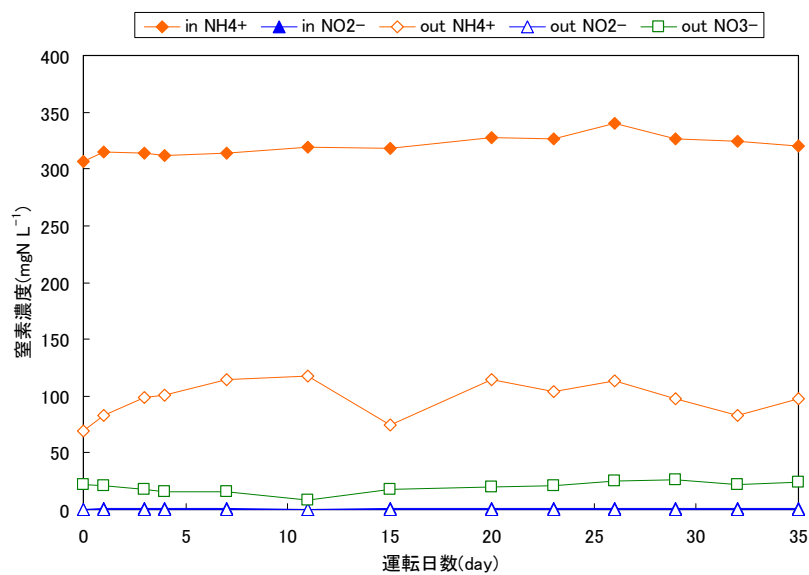


図 3.10 流入・流出における各態窒素濃度の経日変化

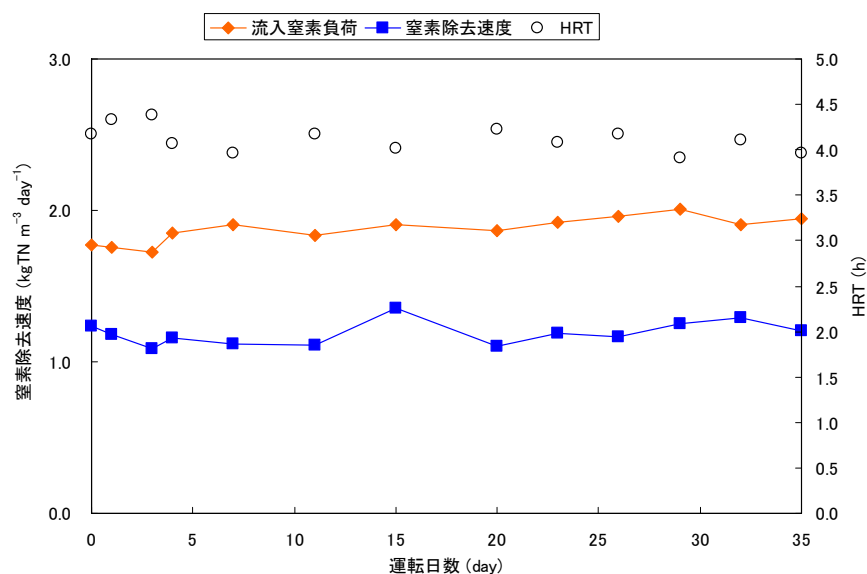


図 3.11 流入窒素負荷・窒素除去速度の経日変化

図 3.10, 3.11 より、流入の窒素負荷を一定とした約 1 ヶ月間の運転では、部分硝化－ANAMMOX リアク

ターの窒素除去性能に変化はなく、処理性能の低下は観察されなかった。流入のアンモニア性窒素濃度を 318 mgN L^{-1} 、HRT を 2 時間として流入窒素負荷を $1.9 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ としたところ、窒素除去速度は $1.2 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ でほぼ一定であった。また、同様に窒素除去率についてもほぼ一定となり、約 70% を維持した。これより、部分硝化-ANAMMOX プロセスにおいて、前段の部分硝化槽が後段の ANAMMOX 槽が与える窒素除去性能上の影響はないことが言える。

表 3.7 にこれまでに報告されている主な部分硝化-ANAMMOX リアクターの性能と本研究の部分硝化-ANAMMOX リアクターの性能の比較を示す。本研究における部分硝化-ANAMMOX リアクターの窒素除去速度は $1.2 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 程度を維持し、既往の研究のものに比べて 1.7 倍程度高い値となった。この要因として挙げられるのが、部分硝化槽の HRT が短いということである。本研究の部分硝化-ANAMMOX リアクターの性能は、ANAMMOX リアクターの性能から考えて、明らかに部分硝化槽の処理性能に律速していることがいえるが、それでも部分硝化槽の HRT は 2 時間程度であり、表 3.3 に示した部分硝化リアクターについての既往の研究のもの（約 1 日）と比較して短い。本研究でリアクターに用いたガラス製のカラムはその形状が細長であり、生物膜担体の充填率が高いことから、短い HRT の中でアンモニア酸化細菌が効率的に反応を行うことができることが部分硝化槽の処理性能が高いことの要因であると言える。とはいうものの、部分硝化-ANAMMOX リアクターとしての性能が部分硝化槽の性能に律速していることから、さらに部分硝化槽の改良をする必要がある。また、ANAMMOX 槽の処理性能から考えて、ANAMMOX 槽の容積を小さくしても性能上の支障は生じないと考えられる。ANAMMOX 槽の容積を小さくすることによって HRT が短縮できるため、全体の窒素除去速度値も上昇する。

表 3.7 各種部分硝化-ANAMMOX リアクターの性能の既往の報告との比較

プロセス	Reactor	Substrate	Influent NH_4^+-N (mg L^{-1})	N removal rate ($\text{kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$)	N removal (%)	Reference
部分硝化-ANAMMOX	連続攪拌-流動床	消化液	584	0.71	83	6.1
	連続攪拌-連続バッチ	消化脱離液	1176	0.75 ± 0.2	-	6.2
	連続攪拌-連続バッチ	消化液	619-657	0.6-2.4	90	6.3
CANON	生物膜	人工排水	318	1.2	70	<i>this study</i>
	連続バッチ	人工排水	-	0.04-0.11	36-92	6.4
	ガスリフト	人工排水	131	0.064	-	6.5
	ガスリフト	人工排水	1545	1.5 ± 0.2	42 ± 4.7	6.6
	UASB	消化脱離液	420	0.06-0.08	80-95	6.7

なお、図 3.12 のように沈殿槽では前段の部分硝化槽から流出したバイオマスが経過日数とともに沈殿したが、流入と流出の各態窒素濃度はほとんど変化せず、沈殿槽において沈殿したバイオマスによる窒素除去はされなかったといえる。なお、沈殿槽の流入のサンプリング地点は図 6.7 の②、流出のサンプリング地点は③とした。

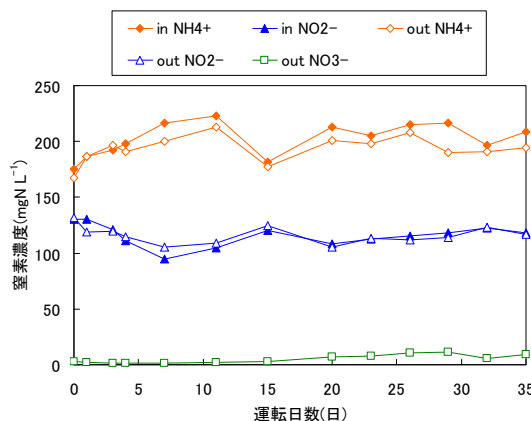


図 3.12 沈殿槽の様子と沈殿槽の流入・流出の各態窒素濃度

FISH 法による各槽の細菌群集構造の把握

窒素除去性能上では, ANAMMOX 槽が部分硝化槽から受ける影響は観察されなかった. また, 図 3.13 に示すとおり, 部分硝化槽との接続による ANAMMOX 槽の外見の変化も観察されなかった. ANAMMOX 槽が部分硝化槽から受ける影響をさらに詳しく調べるために部分硝化槽と接続前後の ANAMMOX 槽の汚泥と部分硝化槽の生物膜に対して FISH 法を行った. 本研究で用いたプローブを表 3.8 に示す.



部分硝化槽と未接続時

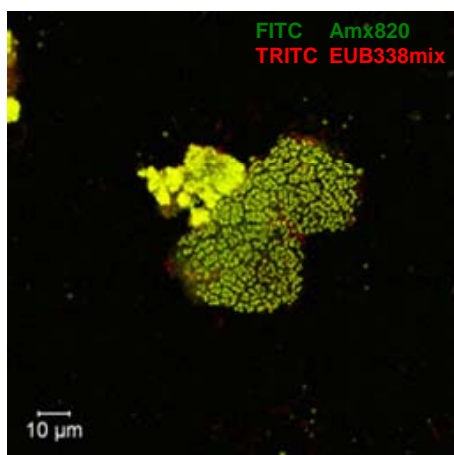
部分硝化槽と接続後30日

図 3.13 部分硝化槽と接続前後の ANAMMOX 槽

表 3.8 本研究で用いたプローブ

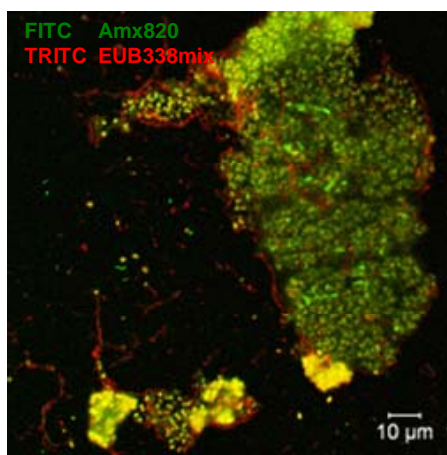
Probe	Sequence (5' to 3')	FA (%)	Specificity	Reference
EUB338	<i>gct gcc tcc cgt agg agt</i>	0-50	Most bacteria	6.8
EUB338II	<i>gca gcc acc cgt agg tgt</i>	0-50	Planctomycetales	6.9
EUB338III	<i>gct gcc acc cgt agg tgt</i>	0-50	Verrucomicrobiales	6.9
Amx820	<i>aaa acc cct cta ctt agt gcc c</i>	40	anammox bacteria	6.10
Nso190	<i>cga tcc cct gct ttt ctc c</i>	35	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria	6.11
NIT3	<i>cct gtg ctc cat gct ccg</i>	40	Nitrobacter spp.	6.12
Ntspa662	<i>gga att ccg cgc tcc tct</i>	35	genus Nitrospira	6.13
GNSB-941	<i>aaa cca cac gct ccg ct</i>	35	Chloflexi	6.14
Comp* for NIT3	<i>cct gtg ctc cag gct ccg</i>	40	—	6.11
Comp* for Ntspa662	<i>gga att ccg ctc tcc tct</i>	35	—	6.12

*Competitor (Unlabeled probe)



画像 3.3 ANAMMOX 槽の FISH 画像
接続前

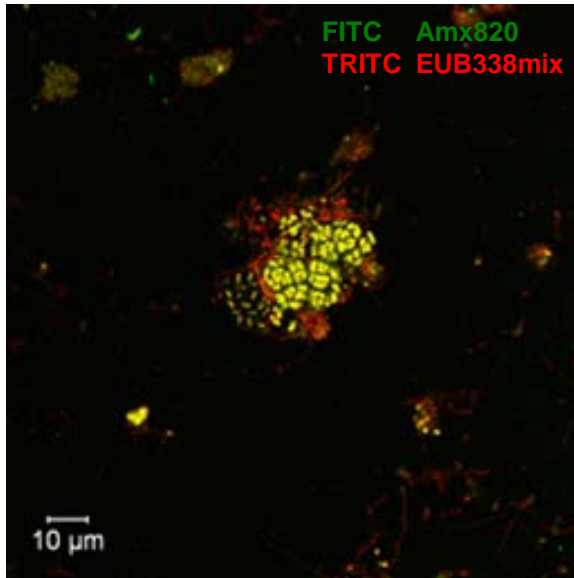
Amx820/EUB338mix による構成比 96.4%



画像 3.4 ANAMMOX 槽の FISH 画像
接続前

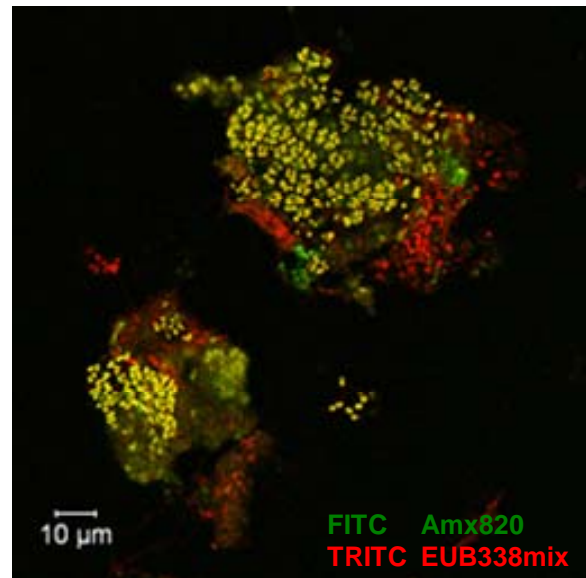
Amx820/EUB338mix による構成比 83.4%

部分硝化槽と接続前の ANAMMOX 槽の FISH 画像を画像 3.3, 3.4 に示す. 接続前の ANAMMOX 槽には, 画像 3.3 のように Amx820/EUB338mix による構成比が 96.4%と ANAMMOX 細菌が高濃度であるものや, 画像 3.4 のように ANAMMOX 細菌以外に細菌 (主に糸状性細菌) が存在し, ANAMMOX 細菌の構成比が 83.4%のものがあつた. このような FISH 画像を 10 回撮影したところ, 全細菌に占める ANAMMOX 細菌の割合は約 83.8%であつた. また, ANAMMOX 細菌以外に着目したアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌については, Nso190, NIT3, Ntspa662 のプローブによる蛍光シグナルが得られず, ANAMMOX 槽には存在しないか, 定量下限であることが確認された.



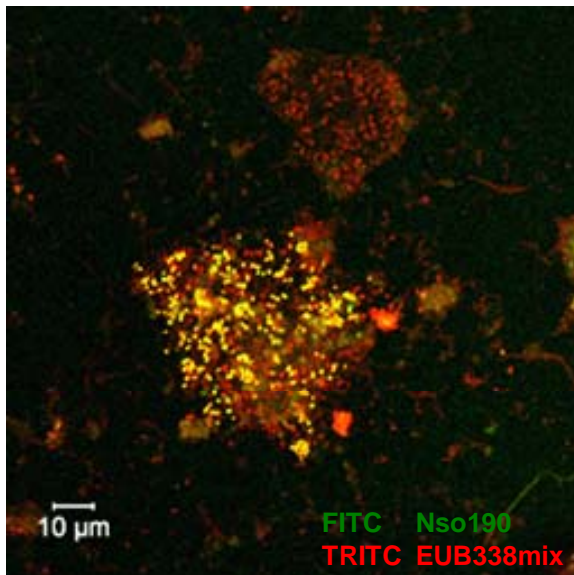
画像 3.5 ANAMMOX 槽の FISH 画像
接続後

Amx820/EUB338mix による構成比 78.7%



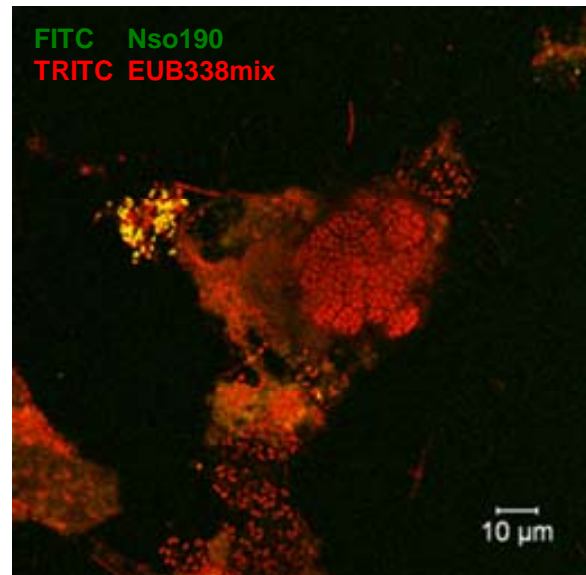
画像 3.6 ANAMMOX 槽の FISH 画像
接続後

Amx820/EUB338mix による構成比 67.9%



画像 3.7 ANAMMOX 槽の FISH 画像
接続後

Nso190/EUB338mix による構成比 30.5%



画像 3.8 ANAMMOX 槽の FISH 画像
接続後

Amx820/EUB338mix による構成比 17.9%

画像 3.5~3.8 に部分硝化槽と接続後 30 日の ANAMMOX 槽の FISH 画像を示す. Amx820 と EUB338mix のプローブで観察したところ, 画像 3.5, 3.6 のように, 接続 30 日経過後では, 接続前に多く観

察された ANAMMOX 細菌や糸状性細菌の他にも球菌が多く観察された。そこで Nso190 と EUB338mix のプローブで観察したところ、画像 3.7, 3.8 が得られ、観察された球菌は、部分硝化槽と接続する前には存在しなかったアンモニア酸化細菌であることが確認された。図 3.14 に接続前 (0 日目) と接続後 30 日の Amx820/EUB338mix あるいは Nso190/EUB338mix による構成比を示す。

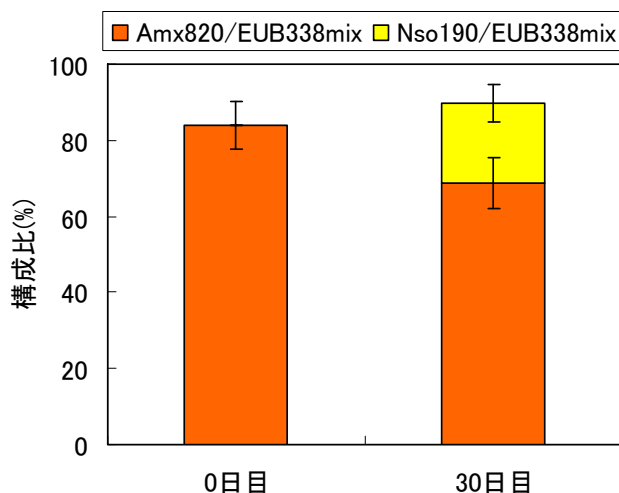


図 3.14 ANAMMOX 槽の構成比の変化

部分硝化槽と接続前の ANAMMOX 槽では全細菌に占める ANAMMOX 細菌の割合は約 83.8%であり、アンモニア酸化細菌の占める割合は 0%であった。接続後 30 日の ANAMMOX 槽ではアンモニア酸化細菌の割合が 76.1% (標準偏差 4.0) を占める部分硝化槽からの流入によって、ANAMMOX 細菌の占める割合が約 68.9% (標準偏差 6.6) に減少し、アンモニア酸化細菌の占める割合が約 20.7% (標準偏差 4.9) に増加した。

このように部分硝化槽と ANAMMOX 槽を接続することにより、後段の ANAMMOX 槽の菌相は変化することが観察された。しかし、部分硝化槽の処理水の流入に ANAMMOX 槽による窒素除去性能の変化は観察されず、菌相の変化による処理性能の低下あるいは上昇は見られなかった。

本節によって得られた事柄を以下に示す。

- 部分硝化-ANAMMOX リアクターの運転で、既往の研究の約 1.7 倍の値である窒素除去速度 $1.2 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 程度の窒素除去性能を維持した。
- アンモニア酸化細菌の割合が約 76.1%を占める部分硝化槽の処理水が流入することにより、接続前では ANAMMOX 細菌が約 83.8%を占めた ANAMMOX 槽では ANAMMOX 細菌の占める割合は 68.9%に減少し、一方でアンモニア酸化細菌の割合は約 20.7%に増加して、ANAMMOX 槽における菌相の変化が観察された。
- 部分硝化槽を接続したことによる ANAMMOX 槽の菌相の変化が観察されたものの、ANAMMOX 槽の窒素除去性能には影響はなかった。

②低級脂肪酸が ANAMMOX プロセスに及ぼす影響の解析

低級脂肪酸が排水中に存在する場合、ANAMMOX 細菌による窒素除去性能及び ANAMMOX 細菌の増殖能にはどのような影響が与えられるかを調査した。調査を行う上での指標として窒素除去性能はアンモニアの除去速度、増殖能は無機炭素取り込み率によってそれぞれ評価を行った。

1) 回分試験による影響評価

ANAMMOX 活性が最大となる各態窒素濃度

24 時間の回分試験を行ったが、アンモニア、亜硝酸性窒素の濃度が 50 mg-N L^{-1} である場合、回分試験終了時には亜硝酸性窒素が枯渇してしまい、ANAMMOX 反応が進行しなくなることが確認された。そこで 24 時間で亜硝酸が枯渇せず、かつ ANAMMOX に対して亜硝酸阻害が起こらない窒素濃度を決定する。

培地の作成は表 3.5 と同様にし、アンモニア性窒素及び亜硝酸性窒素の濃度を 50, 75, 100, 150, 200, 250 mg-N L^{-1} とした。5 mL のバイアル瓶にホモジナイズしたバイオマスと液体培地を添加し、ゴム栓で密栓した。37°C の恒温器内に 24 時間静置し、その後イオンクロマトグラフで各態窒素濃度の測定を行った。回分試験に用いる各態窒素濃度は、各系列のアンモニアの除去速度から決定する。回分試験によって得られた亜硝酸性窒素濃度と窒素除去速度の関係を図 3.15 に示す。

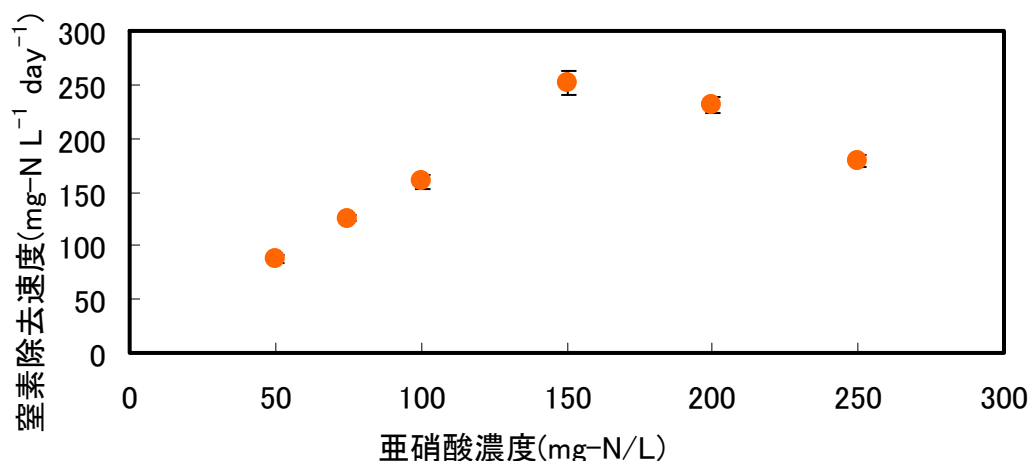


図 3.15 亜硝酸性窒素と窒素除去速度の関係
(エラーバーは 3 検体の標準偏差を表す)

図 3.15 より窒素除去速度が最大となる亜硝酸性窒素濃度は 150 mg-N L^{-1} であった。亜硝酸性窒素濃度が 100 mg-N L^{-1} 以下の場合、24 時間の培養後に亜硝酸の枯渇が確認された。また、 200 mg-N L^{-1} 以上の濃度の場合、亜硝酸阻害が起きていることが確認された。他のカラムのバイオマスについても同様に検討した結果、 150 mg L^{-1} において亜硝酸阻害が確認されたことから、確実に活性を保ち、24 時間で亜硝酸性窒素が枯渇しない窒素濃度は 100 mg L^{-1} であることがわかった。したがって、今後の回分試験においてアンモニア性窒素及び亜硝酸性窒素濃度は 100 mg-N L^{-1} に固定して行うこととした。

有機物質存在下での異化代謝活性(Cold Run)の測定

ギ酸、酢酸、プロピオン酸が存在する場合の ANAMMOX 細菌の異化代謝活性を測定した。図 3.15 より、回分試験によって得られた窒素濃度を用いて行った。

まず、リアクターからバイオマスを採取し、表 3.5 と同様に作成した液体培地を添加してバイオマスのホモジナイズを行う。5 mL の培養ビンに液体培地、ホモジナイズしたバイオマスを添加し、各有機物質を最終濃度 0, 10, 25, 50 mM となるように添加した。添加後にゴム栓で密栓し、37°C の恒温器内で光を遮断した条件において静置培養を行った。24 時間の培養終了後にイオンクロマトグラフを用いて各態窒素濃度を測定し、有機物質を添加していない場合のアンモニア除去速度を 100%として相対評価を行った。各有機

物質を添加した際のアンモニア除去速度の測定結果を図 3.16 に示す。

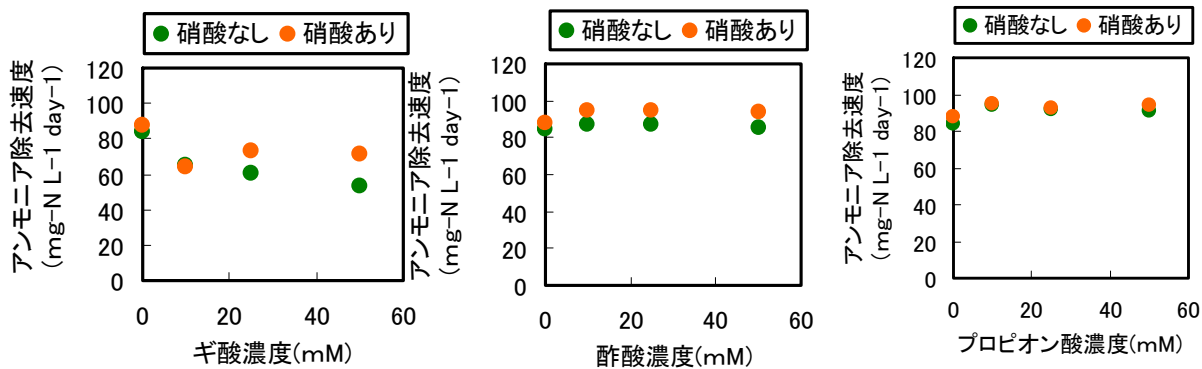


図 3.16 各有機物質濃度とアンモニア除去速度の関係

有機物質を添加していない場合(通常の ANAMMOX), アンモニアの消費速度は $84.3 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。また、硝酸が存在する場合のアンモニア消費速度は $87.5 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。アンモニアの消費速度は硝酸の有無において、硝酸が存在する場合の方が、消費速度が速い傾向が確認された。また、酢酸添加系に関して、わずかではあるが酢酸と硝酸が存在する場合の方が、アンモニア消費速度が速い傾向が観察された。

有機物質を添加していない場合のアンモニア除去速度を 100% として相対評価を行った結果を図 3.17 に示す。本研究では有機物質を添加していない場合のアンモニアの除去速度を ANAMMOX 活性 100% と定義した。

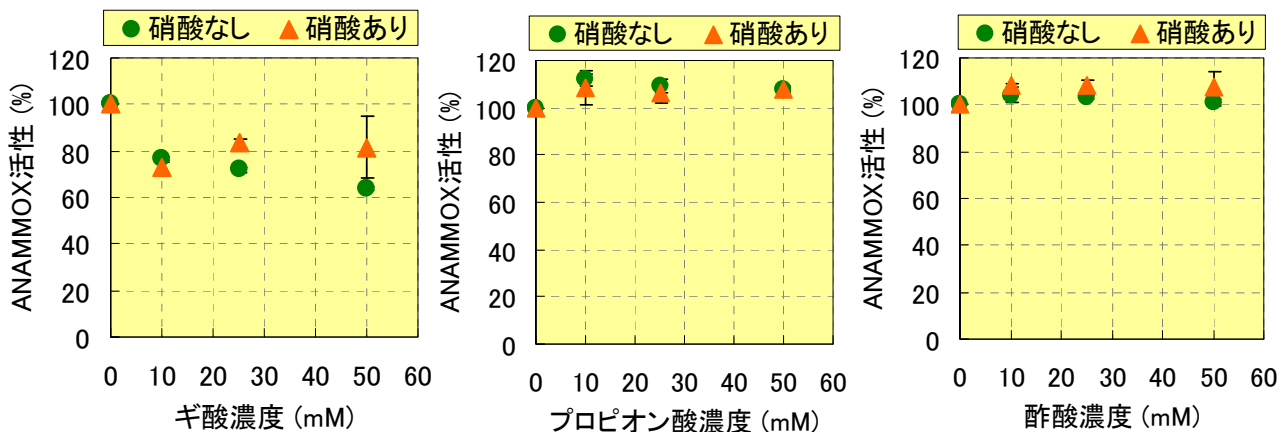


図 3.17 各有機物質濃度と ANAMMOX 活性の関係
(エラーバーは 3 検体平均の標準偏差を示す)

ギ酸添加系において ANAMMOX 活性が減少する傾向が観察され、最大で 40% の活性減少が硝酸なし・ギ酸 50 mM 添加系で観察された。硝酸が存在する場合の方が活性の減少幅が小さい傾向にあった。これは共存する脱窒菌によって、ギ酸が硝酸とともに脱窒反応で分解されたため、ギ酸の濃度が減少することによる減少幅の低下であると考えられる。

酢酸添加系において活性の減少は確認されず、わずかに増加する傾向が確認された。活性の増加率は全培養系において約 10% 程度であった。また、硝酸性窒素存在下の方が硝酸性窒素が存在しない場合

より活性が高い傾向があった。プロピオン酸存在下でも同様に 10%程度活性が増加するという傾向を示したが、酢酸添加系と異なる点は、硝酸性窒素存在下よりも硝酸性窒素が存在しない場合において活性が高い傾向があった。

ANAMMOX 反応の化学量論より、反応比はアンモニア性窒素:亜硝酸性窒素:硝酸性窒素=1:1.32:0.26 と報告されている。今回の回分試験で得られたアンモニアの消費速度より亜硝酸性窒素の消費速度を算出すると、酢酸 25 mM 添加した系では、アンモニアの消費速度が $86.8 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であり、反応に使われる亜硝酸性窒素消費速度は $114.6 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ に相当するが、実際には $96.7 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であり、酢酸添加系において理論値よりも亜硝酸性窒素の消費が少ない結果となった。また、硝酸性窒素生成速度は $22.6 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ となるはずであるが、実際の測定結果は $0 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。ANAMMOX 反応によって生成された硝酸性窒素が全て亜硝酸性窒素に還元された場合、亜硝酸性窒素消費速度は $119.3 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ となり、ANAMMOX 反応の量論比に近い値となる。このことより、硝酸性窒素還元反応(脱窒又は未解明の反応)によって生成された亜硝酸性窒素が ANAMMOX 反応に用いられることで図 3.16 に示したように ANAMMOX 活性が増加したと考えられるが、硝酸還元反応を担う細菌がバイオマス中に共存する脱窒細菌であるか、有機物質を酸化利用する ANAMMOX 細菌であるかどうかは今回の回分試験では不明である。硝酸性窒素なしの系において、酢酸と亜硝酸性窒素による脱窒反応のみを考慮した場合、測定された酢酸消費速度は 15.3 mM day^{-1} であり、これに相当する亜硝酸消費速度は $134 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ となるが、実際には先ほども記述したように ANAMMOX 反応のみでも亜硝酸性窒素消費速度は $96.7 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であるため、酢酸の減少は脱窒反応以外の反応も考えられる。したがって、酢酸、プロピオン酸添加系における ANAMMOX 活性の増加は、各有機物質を利用した硝酸還元が起こっているためであり、酢酸及びプロピオン酸は ANAMMOX 活性に阻害影響を与えないことが示唆された。しかし、ギ酸の添加系は酢酸、プロピオン酸添加系とは異なる傾向を示したことから、ギ酸の存在は ANAMMOX 反応に影響を与えることが示唆された。

有機物質存在下での異化代謝活性(Hot Run)の測定

ギ酸、酢酸、プロピオン酸が存在する場合の無機炭素取り込み量の測定を行った。まず、リアクターからバイオマスを採取し、表 3.5 と同様に作成した液体培地を添加してバイオマスのホモジナイズを行う。5 mL の培養ビンに液体培地、ホモジナイズしたバイオマスを添加し、各有機物質を最終濃度 0, 10, 25, 50 mM となるように添加した。添加後にゴム栓で密栓した。その後、シリンジを用いて ^{14}C で標識された炭酸水素ナトリウムを添加した。37°C の恒温器内で光を遮断した条件において静置培養を行った。24 時間の培養終了後に液体シンチレーションカウンターを用いて放射エネルギーを測定し、有機物質を添加していない場合の無機炭素取り込み率を 100%として相対評価を行った。各有機物質を添加した際の無機炭素取り込み率の測定結果を図 3.18 に示す。

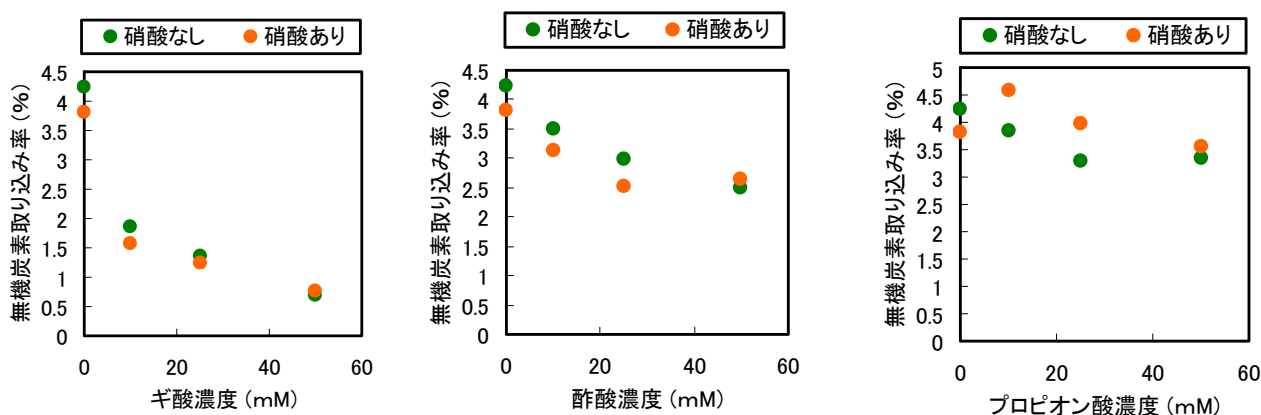


図 3.18 各有機物質添加時の無機炭素取り込み率

有機物質を添加していない場合(通常の ANAMMOX 反応)の無機炭素取り込み率は、硝酸性窒素なしの場合は 4.24%, 硝酸性窒素ありの場合は 3.81%であった. プロピオン酸 10 mM 添加系を除いては有機物質を添加することによって無機炭素取り込み率が減少する傾向が確認された. 全体的に取り込み率が低い, これは ANAMMOX 細菌の倍加時間が非常に短いということによるものである. よって DOC 計などよりも検出限界値が小さい液体シンチレーションカウンターを用いることが有効であったと言える.

ギ酸は酢酸やプロピオン酸と比較しても無機炭素取り込み率は低く, アンモニア減少速度と同様に活性が減少しているため, 阻害影響があることが示唆された. 有機物質を添加していない系の無機炭素取り込み率を ANAMMOX 細菌の同化能 100%と定義し, 有機物質濃度と同化能の関係を無機炭素取り込み率の測定結果より算出し, 図 3.19 に示す.

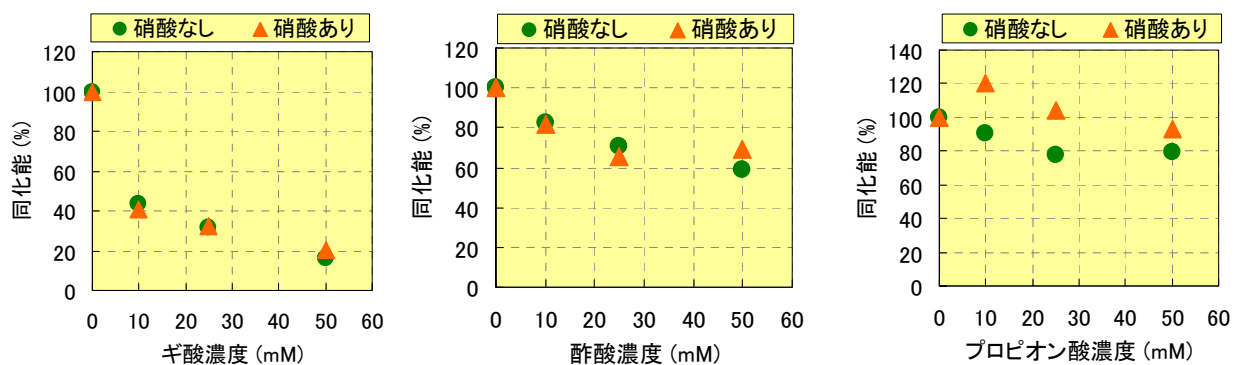


図 3.19 各有機物質濃度と ANAMMOX 細菌の同化能の関係

ギ酸添加系において ANAMMOX 細菌の同化能は減少傾向を示し, ギ酸 50 mM 添加系で減少が最大となり, 約 80%の減少が確認された. また 10 mM の添加においても 60%の減少が確認された. このようにギ酸の存在は ANAMMOX 細菌の同化能に大きく影響を与えることが示唆された. 酢酸添加系においてもギ酸添加系と同様に同化能の減少が確認され, 酢酸 50 mM 添加系で約 40%の減少があった. また, 硝酸性窒素を添加しない系の方が, 硝酸性窒素を添加する系よりもわずかに同化能が高い傾向があった. プロピオン酸の添加系においては硝酸性窒素なしの系では同化能の減少が確認されたが, 硝酸性窒素ありの系においては, プロピオン酸濃度が 25 mM までは同化能は減少せず, 50 mM においては減少は 10%以下であった. また, 硝酸性窒素添加系の方が硝酸性窒素なしの場合よりも同化能が高い傾向があった.

酢酸及びプロピオン酸添加系において ANAMMOX 活性が増加していることから, ANAMMOX 細菌の同化能が増加すると思われる. しかし, ほとんどの系で同化能が減少傾向にあることから以下のようなことが考えられる.

- ① ANAMMOX 細菌が有機物質を直接取り込むため, 無機炭素の取り込み率が減少している
- ② 共存する脱窒細菌による硝酸還元(脱窒反応)によって生成された有機物質由来の無機炭素を ANAMMOX 細菌が取り込んでいるため, 無機炭素の取り込み率が減少している
- ③ 有機物質は ANAMMOX 細菌の菌体合成に直接阻害影響を与える

などのことが考えられる. ①は ^{14}C 標識された有機物質に銀粒子が形成されるかどうか, ②は初期に培地中に存在するノンラベルの CO_2 ではなく, 共存する脱窒細菌の反応に由来する $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みによって確認できると考えられる. これらに関しては ^{14}C 標識された有機物質を用いた MAR-FISH 法を適用することで培地中に存在する炭酸以外の炭素源の存在を確認できると考えられる. また, Candidatus “*Kuenenia stuttgartiensis*” のゲノム解析より, ①は ANAMMOX 細菌は行わないという報告から, ②である可能性が高いと考えられるが, 今回の MAR-FISH の条件では①と②の区別が難しい. さらに②については, ラベリング

された炭素が脱窒反応によって一旦外部に出てノンラベルの CO₂ に希釈され、0.1-0.4%程度と考えられるため、この場合の取り込みによって銀粒子が形成され、取り込みを観察することは難しいと考えられる。MAR-FISH については後述する。

2)16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

回分試験に用いたバイオマス中にどのような ANAMMOX 細菌が存在しているかを 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析によって調査を行った。系統解析の対象としたバイオマスは連続運転リアクターの運転開始から 160 日目、窒素除去速度 4.25 kg-N m⁻³ day⁻¹ のバイオマスに対して行った。このバイオマスから DNA を抽出し、ANAMMOX 細菌が属する *Planctomycetes* 目を対象とした Pla46-Univ1390r のプライマーセットを用いて PCR 増幅を行い、クローニングを行った。PCR 増幅の条件は、最初の熱変性を 94°C で 4 分、94°C で 45 秒、58°C で 50 秒、72°C で 3 分という一連の反応を行うサイクルを 30 回繰り返し、最後の伸長を 72°C で 10 分行う条件を用いて行った。得られたクローンの塩基配列をもとに、系統樹を Neighbor-joining 法を用いて作成した。得られた系統樹を図 3.20 に示す。

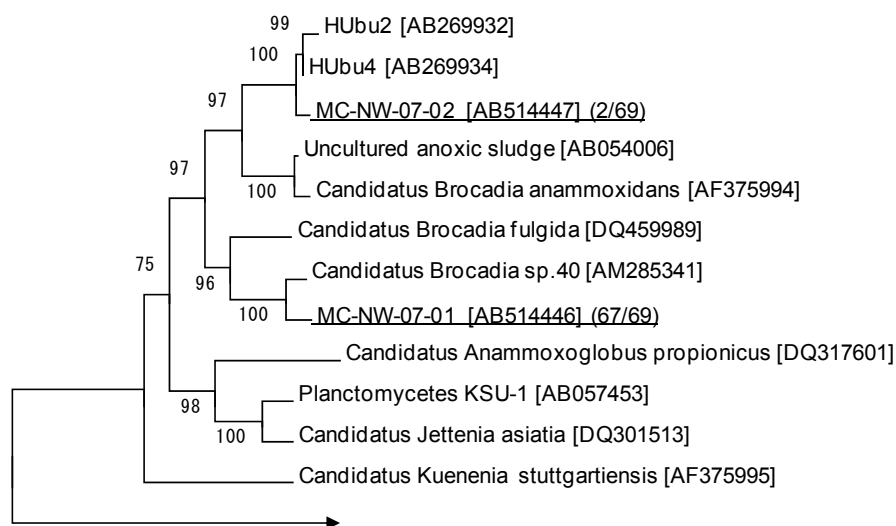


図 3.20 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析によって得られた系統樹
()内は得られたクローン数を示す。

系統解析によって約 1300 塩基長が得られたクローン数は 69 クローンであり、その全てが *Candidatu* “*Brocadia*”に属する ANAMMOX 細菌であった。また、得られたクローンは 2 種類のグループに分類することができ、そのほとんどのクローン(MC-NW-07-01)は酢酸が利用可能であると報告のある *Candidatus* “*Brocadia fulgida*”^{3.1)}、 “*Brocadia sp.40*”^{3.2)} に近縁(97%の相同性)であった。一方、わずかながら検出されたクローン(MC-NW-07-02)はリアクター運転当初に優占化していた ANAMMOX 細菌である HUbu2 及び HUbu4 に近縁(99%の相同性)なものであった。系統解析は定性的であって定量的ではないため、FISH 法を用いた顕微鏡観察を行い、菌の存在割合を求める。FISH 法を用いた顕微鏡観察については次項目に示す。

FISH 法を用いた顕微鏡観察

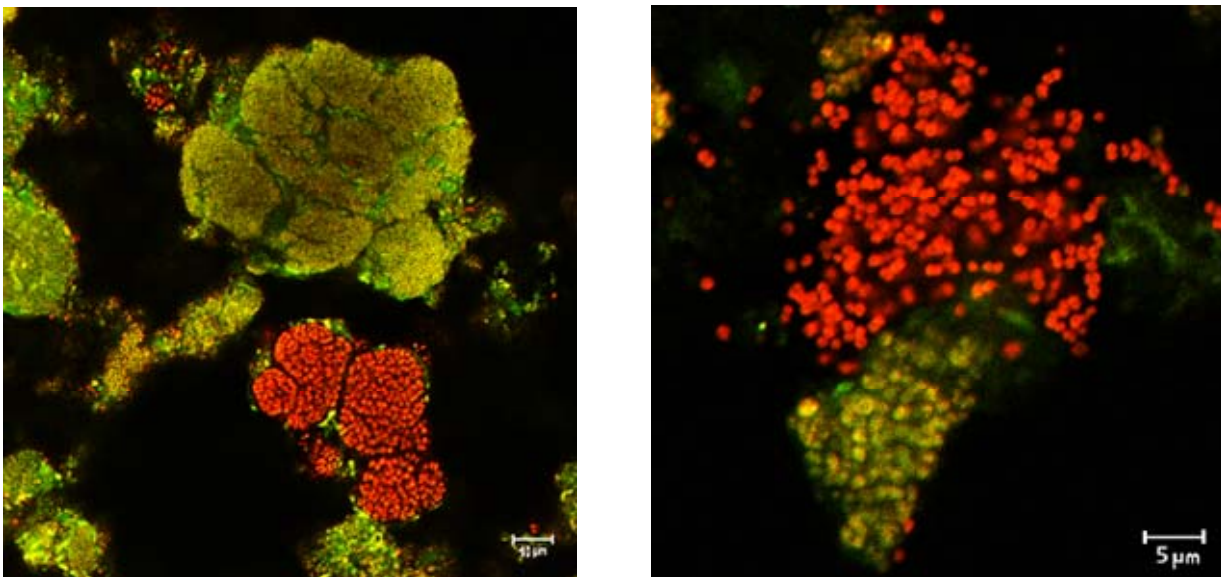
16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析によって、回分試験に用いたバイオマス中に存在する ANAMMOX 細菌の種類が明らかとなった。そこでその結果より FISH 法に用いるプローブを決定し、顕微鏡観察を行う。バイオマス中に存在する 2 種類の ANAMMOX 細菌の存在割合を求めるために、蛍光面積比を用いて算出した。蛍光面積比は 12 視野の平均を用いた。また、MAR-FISH 法を用いた顕微鏡観察で用いるプロ

ープの決定を行うことを目的とする。

用いたプローブは ANAMMOX 細菌をターゲットとした Amx820(TRITC), 全バクテリアをターゲットとした EUBmix, 系統解析によって得られた塩基配列から設計した Bsp613 を用いた. Bsp613 は検出されたクローンの配列と既存のプローブの配列を比較したところ, 1 塩基異なる部分が存在し, ミスマッチを修正したプローブとして用いた. その結果, ANAMMOX 細菌の形態を有する細菌が蛍光標識され, 視覚的に観察することが可能であった.

バイオマス中の ANAMMOX 細菌の存在割合を $\text{Amx820/EUBmix} \times 100$ (%) で算出したところ, ANAMMOX 細菌が占める割合は $94.2 \pm 4.1\%$ であり, かなりの高濃度で ANAMMOX 細菌が集積されていることが明らかとなった.

ANAMMOX 細菌に特異的なプローブ Amx820 と酢酸利用種に近縁な ANAMMOX 細菌に特異的なプローブ Bsp613 を用いて顕微鏡観察を行った結果, バイオマス中には 2 種類の ANAMMOX 細菌が観察され, クローン解析と同様の結果となった. Amx820, Bsp613 を用いた FISH 画像を画像 3.9 に示す.



画像 3.9 Amx820(TRITC)と EUB mx(FITC)を用いた FISH 画像 (右は拡大図).

画像 3.9 の赤色で蛍光標識された ANAMMOX 細菌は, リアクター運転当初に優占化していた ANAMMOX 細菌である HUb2 及び HUb4 に近縁なものであり, 黄色(赤+緑)で蛍光標識された ANAMMOX 細菌は酢酸が利用可能であると報告のある *Candidatus "Brocadia fulgida"*, "*Brocadia sp.40*" に近縁な ANAMMOX 細菌である. 得られた画像はそのほとんどが酢酸利用種に近縁な ANAMMOX 細菌で構成されており(黄色の部分), この種が優占種であることが明らかとなった. この 2 種類の ANAMMOX 細菌の形態的な違いは, *Candidatus Brocadia sp.* に近縁な種は密なクラスターで存在しており, HUb4 に近縁な種は分散されたクラスター状態で存在していた点である. また, 画像 3.9 において ANAMMOX 細菌種間での菌体の大きさの違いはほとんどなく, 顕微鏡付属の画像解析ソフトにより 1 cell の大きさを測定したところ, ともに $0.8-1.0 \mu\text{m}$ であった.

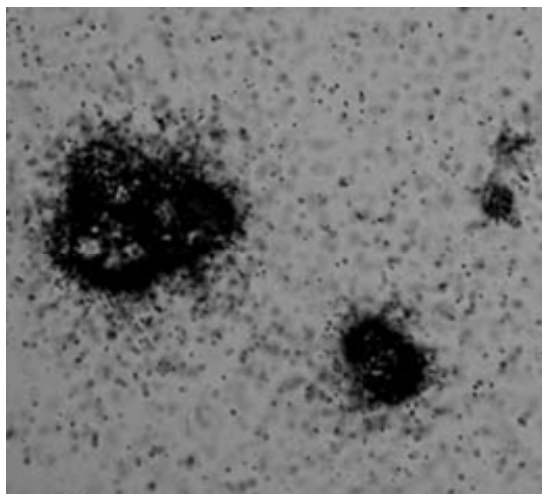
以上のことより, MAR-FISH 法を用いた顕微鏡観察は Amx820, EUBmix, Bsp613 の 3 種類のプローブを組み合わせて行うこととした.

3) MAR-FISH 法を用いた顕微鏡観察による有機物質の追跡実験

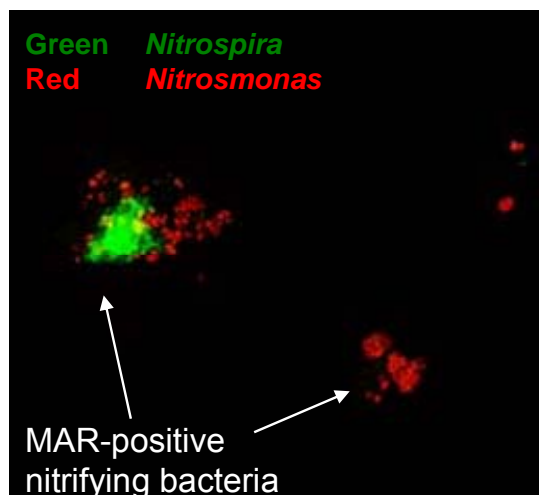
回分試験の結果において, 有機物質の濃度と ANAMMOX 活性, ANAMMOX 細菌の同化能の測定結果が逆の傾向を示したことから, 有機物質由来の炭素を取り込んでいる可能性が示唆された. そこで, ^{14}C

標識されたギ酸, 酢酸, プロピオン酸を回分試験時に添加し, 24 時間後に取り込んでいるかどうか液体シンチレーションカウンターを用いて確認を行い, さらに MAR-FISH 法を用いて ^{14}C 標識された炭素の取り込みを視覚的に観察し, 有機物質由来の炭素の取り込みが起こっているかどうかの確認を行うことを目的とした.

本研究では Okabe ら^{3,3)} の手順に準じて MAR-FISH 法を行った. MAR-FISH 法は, 放射性同位元素で標識された基質を用いて微生物を培養し, 画像 3.10 に示すフィルムコーティングと現像を含む Microautoradiography によって微生物の基質の利用特性を把握し, FISH 法によってその基質を利用する微生物を特定するという方法である. 微生物に取り込まれた放射性同位元素が存在する部分は露出・感光することで銀粒子を形成する. 例として, 画像 3.10 に銀粒子画像 (MAR 画像), 画像 3.11 に FISH 画像を示す. 画像 3.10 で黒く表示されている部分が銀粒子を表し, その位置に放射性同位元素が存在することを表している. 画像 3.11 では異なる細菌を緑 (FITC) と赤 (TRITC) で染め分けたものが表示されている. MAR 画像上の銀粒子の位置に重なる細菌が放射性同位元素で標識された基質を取り込む細菌 (MAR-Positive) を表している. 一方, FISH 法によって染色した細菌の位置に銀粒子が存在しない場合は, その細菌は着目した基質を利用できない細菌 (MAR-negative) であることが判断できる. 画像 3.10 と画像 3.11 は, 亜硝酸酸化細菌とアンモニア酸化細菌が, 着目した基質に対して MAR-positive であることを表している.



画像 3.10 MAR 画像



画像 3.11 FISH 画像

培養手順

MAR-FISH 法を行うにあたって最初に行うのが放射性同位元素で標識された基質(RI)をトレーサーとして用いた培養であるが, 培養方法は着目する微生物によって異なる. 本研究では嫌気性微生物をターゲットとしているため, 回分試験と同様に嫌気条件を維持したまま行った. 回分試験(Cold Run)と同様にゴム栓で密栓する段階まで同様に行った. この際に MAR-FISH 法の前段階の培養として, 有機物質濃度がそれぞれ 25 mM となるように作成した基質を用いた. その後シリンジを用いて ^{14}C 標識されたギ酸, 酢酸, プロピオン酸を最終濃度 100 nmol となるように注入した. ^{14}C 標識されたギ酸, 酢酸, プロピオン酸を添加後, 24 時間 37°C で培養を行い, 培養終了後に液体シンチレーションカウンターを用いてどの程度バイオマスに放射性同位元素が取り込まれたかを測定した. 表 3.9 に MAR-FISH 法で用いた培養系列を示す.

表 3.9 MAR-FISH 法の培養系列

	有機物質	濃度	硝酸	備考
1	ギ酸	25 mM	なし	活性系
2	ギ酸	25 mM	あり	活性系
3	ギ酸	25 mM	なし	対照系
4	ギ酸	25 mM	あり	対照系
5	酢酸	25 mM	なし	活性系
6	酢酸	25 mM	あり	活性系
7	酢酸	25 mM	なし	対照系
8	酢酸	25 mM	あり	対照系
9	プロピオン酸	25 mM	なし	活性系
10	プロピオン酸	25 mM	あり	活性系
11	プロピオン酸	25 mM	なし	対照系
12	プロピオン酸	25 mM	あり	対照系

表 3.9 中の対照系とは培養開始前に 70°Cの低温殺菌を行うもので、液体シンチレーションカウンターを用いて取り込み量を測定する際に、放射性同位元素がどれぐらい菌体に吸着しているかを確認するために行ったものである。

放射性同位元素測定

放射性同位元素を基質として用い培養を行った後、バイオマス中にどの程度放射性同位元素が取り込まれたかを確認した。その結果を図 3.21 に示す。

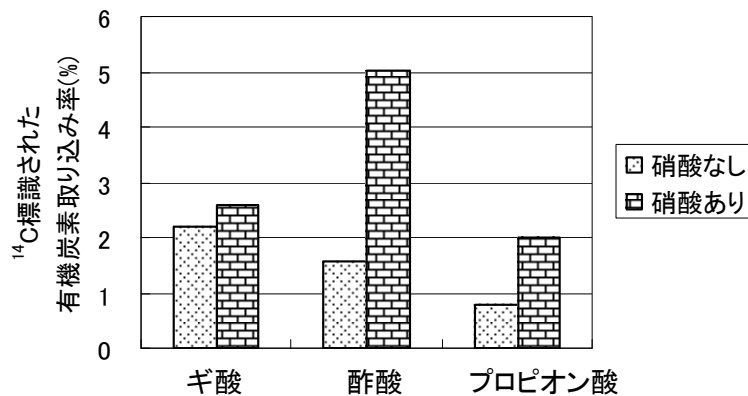
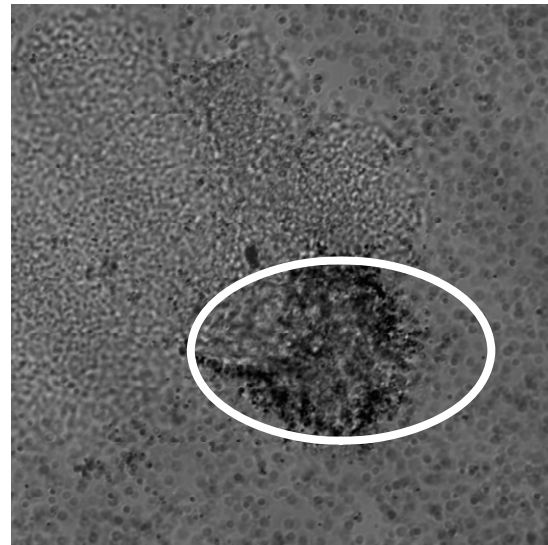
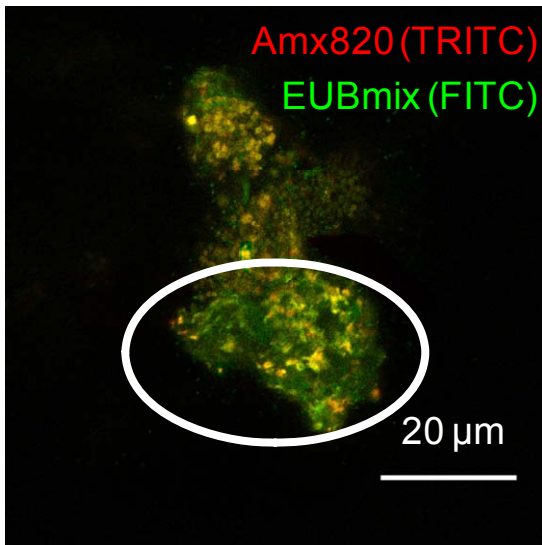


図 3.21 液体シンチレーションカウンターを用いた ¹⁴C で標識された有機炭素の取り込み率測定結果 (有機物質名は添加した ¹⁴C 標識された有機物質名を示す)。

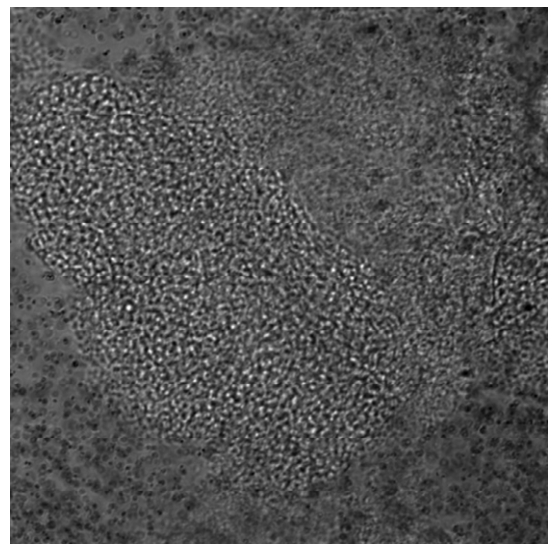
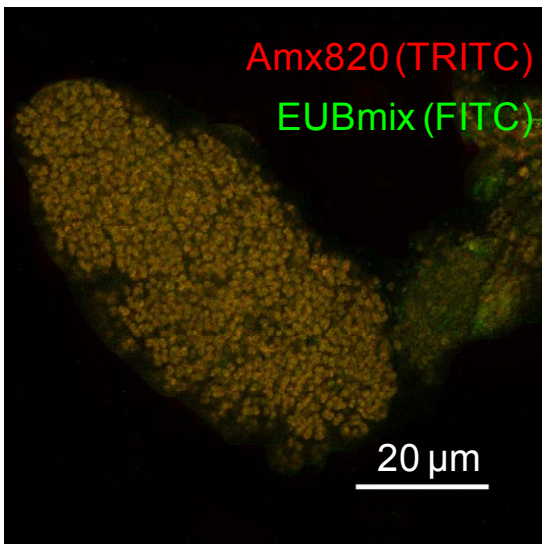
3 種の有機物質において取り込みが確認された。硝酸ありの酢酸添加系において比較的高い取り込みが観察された。また、ギ酸に関しては硝酸の有無に関わらず同程度の取り込みが確認されたことから、ギ酸は硝酸が存在していなくても微生物に取り込まれたことがわかる。酢酸及びプロピオン酸においては、硝酸存在下において硝酸が無い場合よりも高い取り込みが確認された。これらの系において MAR-FISH 法による顕微鏡観察が可能であることが示唆された。しかし、経験上 1%以上の取り込みが無いと MAR-FISH 法を用いた顕微鏡観察において銀粒子の観察が困難である。硝酸なしのプロピオン酸添加系において取り込み率が 1%以下であったが、全く観察が不可能であるというわけではないため、MAR-FISH 法による観察を行った。また、低温殺菌を行った対照系の取り込み率はほぼ 0 であったため、吸着によるものはほとんど無いと考えられる。

MAR-FISH 法による顕微鏡観察

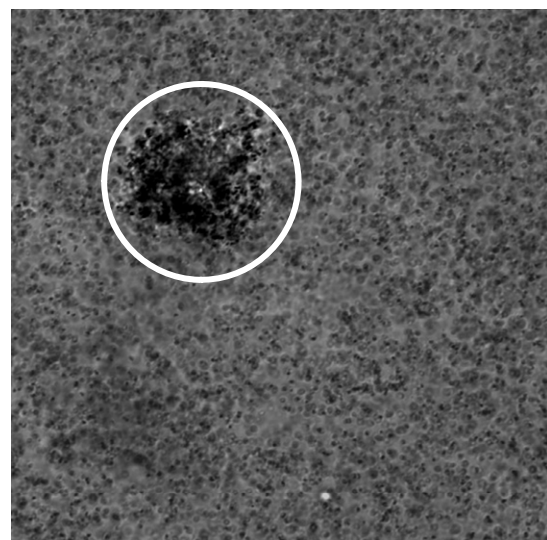
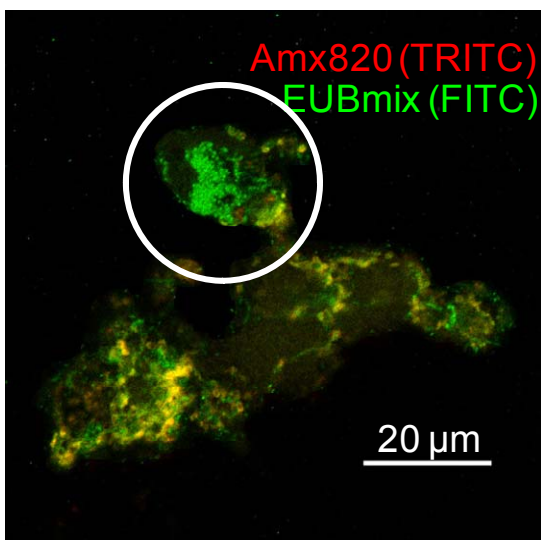
MAR-FISH 法による顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察によって得られた画像を画像 3.12-3.15 に示す。



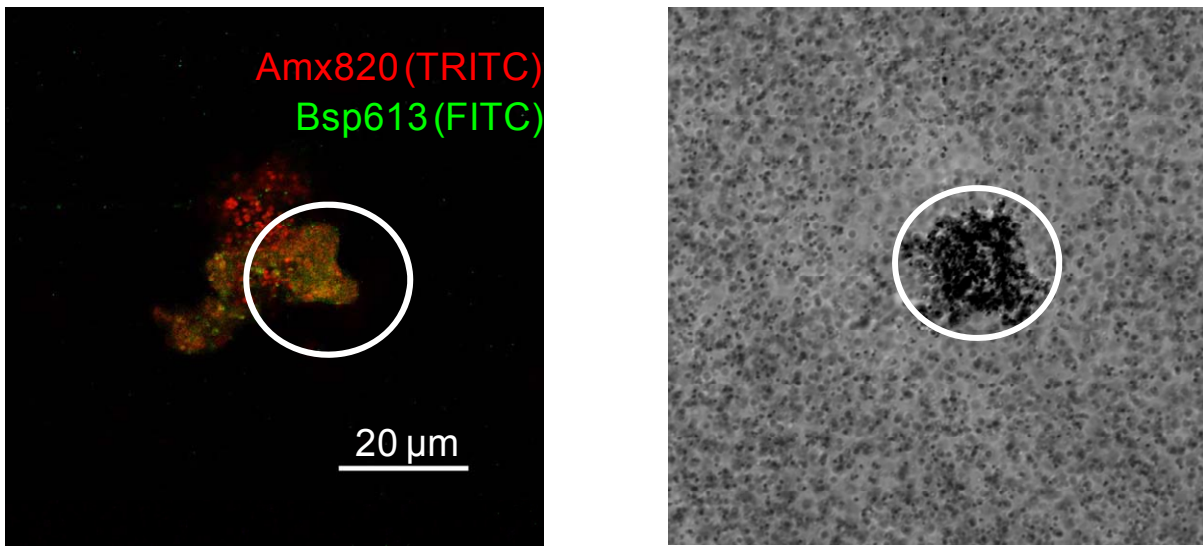
画像 3.12 硝酸ありのギ酸添加系における FISH 画像(左)と MAR 画像(右)



画像 3.13 硝酸ありのプロピオン酸添加系における FISH 画像(左)と MAR 画像(右)



画像 3.14 硝酸ありの酢酸添加系における FISH 画像(左)と MAR 画像(右)



画像 3.15 硝酸ありの酢酸添加系における FISH 画像(左)と MAR 画像(右)

画像 3.12 は硝酸ありのギ酸添加系における MAR 画像と FISH 画像である. この画像は共存する細菌によるギ酸の取り込み画像であり, ギ酸は主に共存する細菌によって取り込まれていることが確認された. 画像 3.13 は硝酸ありのプロピオン酸の画像であるが, プロピオン酸は ANAMMOX 細菌による取り込みは観察されなかった. 画像 3.14 及び画像 3.15 は硝酸ありの酢酸の取り込み画像で, 酢酸は ANAMMOX 細菌による取り込みがはっきりと確認された. さらに, 酢酸は酢酸利用型の ANAMMOX 細菌によってのみ取り込まれていることが確認された. その他の MAR-FISH 法を用いた顕微鏡観察による有機物質の追跡実験の結果をまとめたものを表 3.10 に示す.

表 3.10 各培養系列と細菌による取り込みの有無

	Clone MC-MW-07-01	Clone MC-MW-07-02	coexisting bacteria
ギ酸	—	—	+
ギ酸+硝酸	—	+	+
酢酸	—	+	+
酢酸+硝酸	—	+	+
プロピオン酸	—	—	+
プロピオン酸+硝酸	—	—	+

(+: 取り込みが確認された, —: 取り込みが確認できなかった)

Clone MC-MW-07-01 は HUb4 に近縁な ANAMMOX 細菌を表し, Clone MC-MW-07-02 は酢酸利用種に近縁な ANAMMOX 細菌を表す. プローブ Amx820 とプローブ EUBmix を用いて顕微鏡観察を行った結果, 全培養系において EUBmix で蛍光標識された細菌による有機物質の取り込みが確認された. その中でもギ酸+硝酸性窒素, 酢酸, 酢酸+硝酸性窒素の 3 つの培養系において Amx820 で蛍光標識された細菌による有機物質由来の炭素の取り込みが確認された. プローブ Amx820 とプローブ Bsp613 を用いた際の顕微鏡観察では, ギ酸+硝酸性窒素, 酢酸, 酢酸+硝酸性窒素の 3 つの培養系において, Bsp613 で蛍光標識された細菌による有機物質由来の炭素の取り込みが観察された. その中でも酢酸+硝酸性窒素培養系では顕微鏡観察において, 取り込みを示す銀粒子の存在が多く観察された. 今回の顕微鏡観察では, 共存する細菌によるプロピオン酸の取り込みは観察されたが, ANAMMOX 細菌によるプロピオン酸由来の炭素の取り込みは観察されなかった.

酢酸添加系において, ANAMMOX 細菌による有機物質由来の炭素の取り込みが確認されたことから,

酢酸添加系におけるANAMMOX活性の増加及び同化能の減少が硝酸還元による亜硝酸性窒素の生成と酢酸の酸化によって生成された無機炭素の取り込みが考えられる。また、今回設定したMAR-FISHの条件ではANAMMOX細菌によるプロピオン酸の取り込みが観察されず、同化能の測定結果とは一致しなかった。この理由としては、プロピオン酸は液体シンチレーションカウンターによる ^{14}C -プロピオン酸由来の炭素の取り込みは小さく、今回の露出時間では銀粒子の形成が確認できなかったと考えられる。今回の観察では露出時間を全ての系で統一しており、今後は露出時間を長く設定する、 ^{14}C -プロピオン酸濃度の増加及び培養時間の短縮など条件を最適化し、プロピオン酸由来の炭素取り込みの有無を検討する必要があると考えられる。

本節によって得られた知見を以下に示す。

- 連続運転中のリアクター内のバイオマスを回分試験に用いる際の各態窒素濃度は 100 mg-N L^{-1} が適している。
- バイオマス中のANAMMOX細菌は90%以上の高濃度に集積されていることがわかった。さらにバイオマス中には2種類のANAMMOX細菌が存在し、優占化していたANAMMOX細菌は酢酸利用種に近縁なものであった。
- ギ酸は活性阻害の要因となり得ることが明らかとなった。酢酸は活性を増加させる傾向があり、プロピオン酸はアンモニアの除去に関しては活性増加を促す傾向があることが明らかとなった。
- ギ酸、酢酸はANAMMOX細菌によって取り込まれ、取り込みは硝酸が存在する場合に多く取り込まれる傾向にあることが明らかとなった。プロピオン酸のANAMMOX細菌による取り込みは今回の条件では観察されなかった。今後は条件を最適化し、グラニューールレベルだけではなく、シングルセルレベルでの観察を行う必要があると思われる。

③脱離液供給による評価

- 1) 人工基質によって馴致された ANAMMOX リアクターに溶存態脱離液 (0.45 μm 透過後) を供給した際の窒素除去の挙動の検討
- 2) 人工基質および溶存態脱離液 (0.45 μm 透過後) によって馴致された場合における窒素除去性能に及ぼす影響の検討
- 3) 人工基質および溶存態脱離液 (0.45 μm 透過後) によって馴致された場合におけるグラニュールに及ぼす影響の検討
- 4) 人工基質馴致汚泥と溶存態脱離液馴致汚泥の ANAMMOX 活性の検討
- 5) 懸濁態脱離液 (500 μm 透過後) を供給した際の窒素除去速度の検討
- 6) 人工基質および脱離液を供給したリアクターにおける窒素除去当たりの N_2O 転換率の算出と N_2O 発生傾向の検討

1) 溶存態脱離液を供給した際の窒素除去

人工基質において馴致された汚泥を上向流リアクター内に所定量充填し、人工基質および畜産廃棄物プラントより採取したメタン発酵脱離液を 0.45 μm のメンブレンフィルターによりろ過したろ液を基質とし、これらを ANAMMOX リアクターに様々な条件により連続供給した。また、溶存態脱離液において馴致された汚泥を槽型リアクター内に所定量充填し、懸濁態脱離液 (500 μm 透過後) を連続供給する実験を行った。

種汚泥

上向流リアクターに充填する汚泥としては、約一年間人工基質にて培養したものをを用いた。また、懸濁態脱離液 (500 μm 透過後) を連続供給する実験における種汚泥としては溶存態脱離液において馴致された汚泥を用いた。

図 3.22 に示すように実験装置のリアクターは、ガラス製の胴径 18mm、全長 80mm、容量 13.2ml のバイオカラム吸収管 (GENERAL: 型番 KF-18) を用いた。このバイオカラム吸収管内部の上下には、グラニュールの流出を防ぐため 100 μm 孔の金網を設置した。このカラム内に所定量の ANAMMOX 馴致汚泥を約 1mm のグラニュールの形状を保ったまま投入した。また、図 3.23 に示すようにアクリル製の容積 100 mL の装置も用いることとした。こちらは、マグネティックスターラー (MASUDA: 型番 SM-15H) および攪拌子 (寸法 20 mm, $\phi=6$ mm) を用いて装置内を攪拌する槽型リアクターとして運転した。

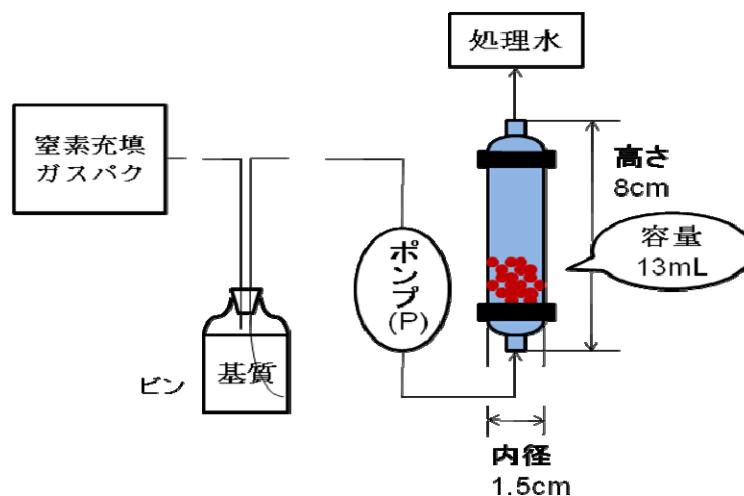


図.3.22 ANAMMOX リアクター概要図 (上向流型)

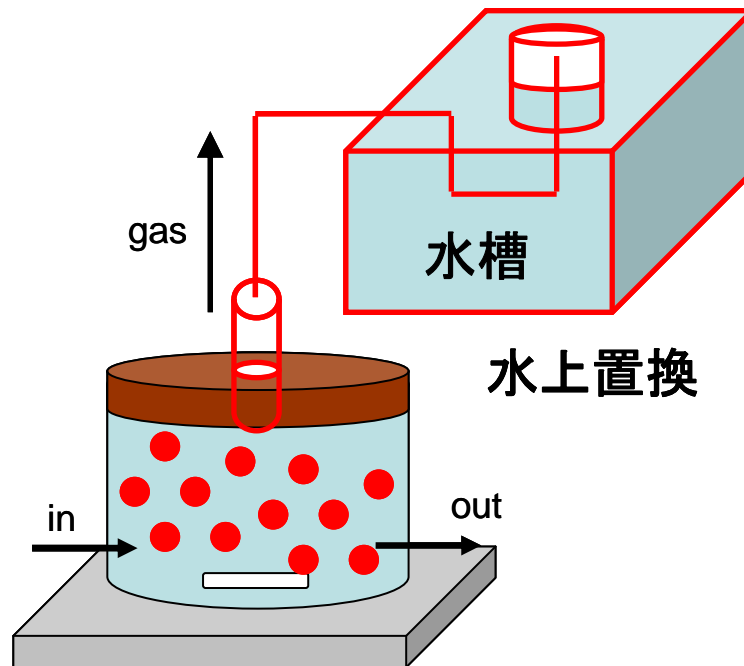


図.3.23 ANAMMOXリアクター概要図(槽型)

脱離液発生源および処理方法

本研究で用いた脱離液は、畜産廃棄物処理プラントでのメタン発酵過程により排出されたものを採取し、ポリタンクで冷蔵輸送して頂いたものを用いた。脱離液は、3箇所の畜産廃棄物処理プラントから頂いており、それぞれのプラントの運転条件を表 3.11～表 3.12 に示す。脱離液は到着直後に 2 mm 以上の爽雑物を 2 mm ふるいを用いて取り除いた。また、供試水として用いる懸濁態脱離液は 500 μm ふるい透過後のものを用いた。また、供試水として用いる溶存態脱離液の精製法は、懸濁物を除去するため遠心分離装置 (KOKUSAN: 型番 H-610S, 無菌式連続ロータ(容量 1000 mL)) において 12000 rpm, 分離槽滞留時間約 20 min の条件で遠心分離を行い、さらにその上澄み液を上記の条件において遠心分離を行った。さらに、その遠心分離後の脱離液に加圧ろ過装置 (ADVANTEC: 型番 DF-9, KS-142) を用いて 0.45 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC: 混合セルロースエステルタイプ 型番 A045A142C) でろ過を行った。このろ過後の脱離液は $\text{NH}_4\text{-N}$ の揮散を防ぐために密栓瓶に入れ、冷蔵庫にて保存した。

表 3.11 運転条件 1

場所	鹿児島県垂水市
処理対象物	豚糞尿 (窒素阻害を考慮して TS5-6% に調整したもの)
処理条件	中温発酵処理 (38°C) HRT 40 日 VS 容積負荷 1.0kg-VS/m ³ /day

表 3.12 運転条件 2

場所	北海道河西群芽室町
処理対象物	乳牛糞尿
処理条件	HRT 160 日

表 3.13 運転条件 3

場所	北海道札幌市(北海道大学)
処理対象物	乳牛糞尿(中小家畜を含む)
処理条件	中温発酵処理(35~38°C) HRT 25 日 発酵槽 100m ³

供試水に用いる脱離液の性状

運転条件 1 の脱離液は 0.45 μm のメンブランフィルター透過後のろ液のみの各種成分を測定した。また、運転条件 2 および 3 の脱離液については、2 mm のふるい透過後の爽雑物を除去した液、0.45 μm 透過後のろ液および一部 500 μm のふるい透過後の液について各種成分を測定した。

その結果として、運転条件 1 の溶存態脱離液について、無機態窒素のうち $\text{NH}_4\text{-N}$ が圧倒的に占め、その濃度は 1500~3200 mg-N/L であった。また、DOC は、392~1030 mg-C/L となり、DOC / DTN は 0.28~0.40 と窒素過多の値を示した。また、DOC / E_{260} は 32~40 であるため、脱離液中有機物成分のうち生物難分解性有機物成分がほとんどを占めるという傾向が得られた。そのため、生物易分解性 DOC / DTN は 0 に近似されると考えられる。有機酸についても測定した結果、この脱離液からは検出されなかった。

次に、運転条件 2 の脱離液については、TS が 45.8 g/L、TOC が 18000 mg-C/L と高濃度な値を示し、運転条件 3 に比べると、それぞれ約 1.4 倍、約 1.6 倍大きかった。また、TS のうち DS は約 30 % で、TS のうち VTS は 66 % であることから、高濃度の SS および有機物を含有していることがわかった。また、TOC のうち DOC は 11 % であり、DOC / E_{260} 値は 34 であったことから、溶存態の有機物は全有機物の中のわずかであり、その有機物の中には、条件 1 と同様に生物易分解性の有機物はほぼ含まれていないということがわかった。しかしながら、有機酸の濃度に注目すると酢酸とプロピオン酸の合計で、約 80 mg-C/L と DOC / E_{260} 値に反して、あまり無視できない値であった。

さらに、運転条件 3 の脱離液についても、条件 2 の TS および TOC の値に比べると低かったということ以外は、おおよそ同等の値を示した。また、条件 3 の 2009 年 10 月 19 日、同年 12 月 4 日および 2010 年 1 月 7 日採取の脱離液については、2 mm のふるい透過後の液の成分とともに 500 μm のふるい透過後の液の成分の濃度測定を行った。その結果、全ての成分において 500 μm のふるい透過後は 2 mm のふるい透過後の中の 80 % 以上を占めていることがわかった。

リアクターの経日変化

各窒素濃度、除去率および窒素容積負荷・除去速度の経日変化

図 3.24~3.33 に各リアクターにおける各窒素濃度、除去率および窒素容積負荷・除去速度の経日変化を示す。

脱離ろ液系では、運転開始から 38 日目まで(実測データはない)は、人工基質系 RUN1 と同様の条件で、人工基質を供給し、その後脱離液希釈液 100 % の供給に変更した。すると、条件変更から 1 週間までは $\text{NO}_2\text{-N}$ は 90 % 以上の除去率を示していたが、2 週間後の測定時には $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率は 65 % となり、その後も低下し続けた。このことは、混合比変化系と同様に人工基質に含有していた窒素成分以外の微量栄養塩類が供給されなくなったことが原因の一つとして考えられる。または、脱離液成分による ANAMMOX 反応への阻害が考えられる。この除去率の低下により、RUN2 において脱離液 100 % の条件は変えずに、 $\text{NH}_4\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度を極端に下げ、RUN2~RUN3 にかけて徐々に窒素濃度を上昇させていく運転を実施した。すると、窒素除去速度は徐々に回復を示し、7.8 kg-N/m³/day の窒素容積負荷に対して、6.8 kg-N/m³/day の窒素除去速度が得られた。このことから、RUN4 において RUN1 と同様の条件に戻して運転を行った。すると、条件変更直後から $\text{NO}_2\text{-N}$ はほぼ 100 % の除去率を示し、49 日間の運転期間の中

でその除去率を常に維持し続けた。

人工基質系では、槽内に窒素が残留する程度の窒素容積負荷を与える実験を行った。その結果、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 容積負荷 $5.9 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ において 84 %の $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率を示していたが、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 容積負荷 $15 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ とすると、反応が完全に停止した。その後、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 容積負荷 $1.9\sim 2.6 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ において運転すると、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率は 75~97 %となり、除去率が回復し、さらに槽内に窒素が残留した。

懸濁態脱離液系では、懸濁態脱離液供給開始から 33 日間で $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度は $0.86 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ から $0.18 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ まで、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去速度は $0.83 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ から $0.33 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ まで低下した。

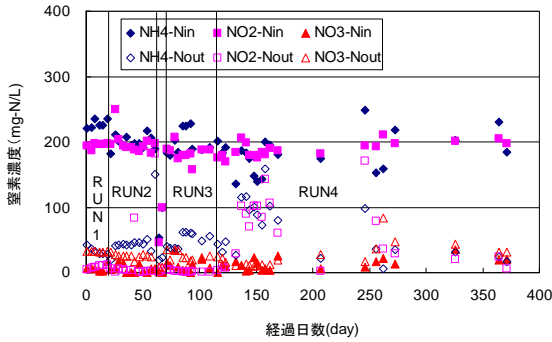


図 3.24 人工基質系の窒素濃度の経日変化

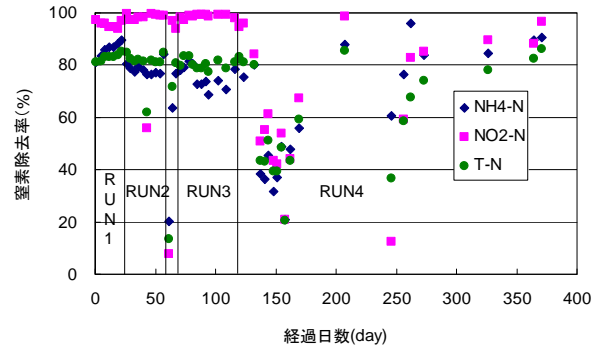


図 3.25 人工基質系の窒素除去率の経日変化

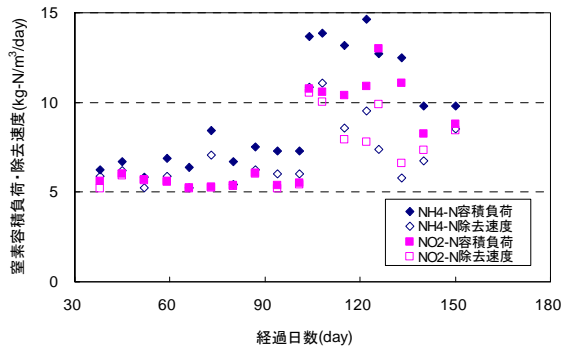


図 3.26 人工基質系の窒素除去速度の経日変化

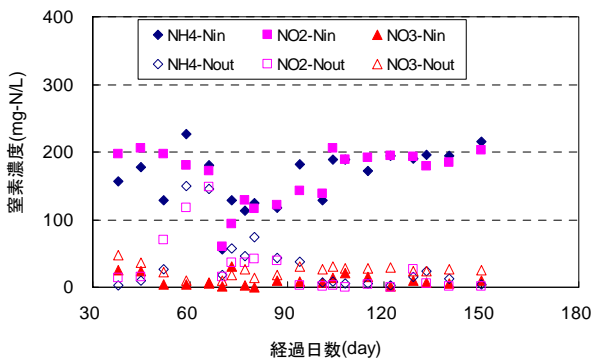


図 3.27 脱離ろ液系の窒素濃度の経日変化

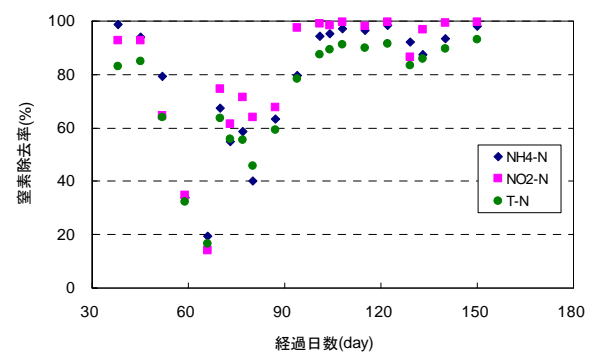


図 3.28 脱離ろ液系の窒素除去率の経日変化

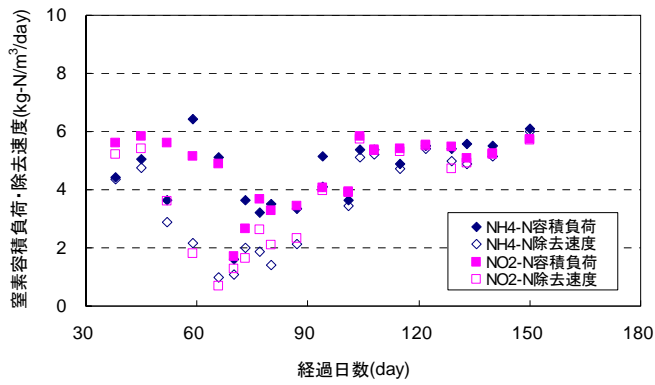


図 3.29 脱離ろ液系の窒素除去速度の経日変化

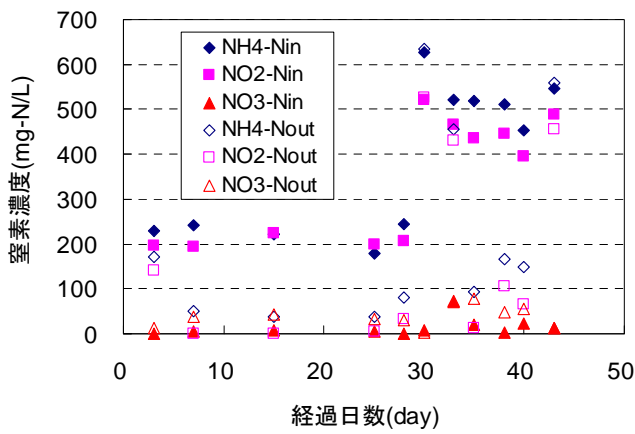


図 3.30 人工基質系の窒素濃度の経日変化

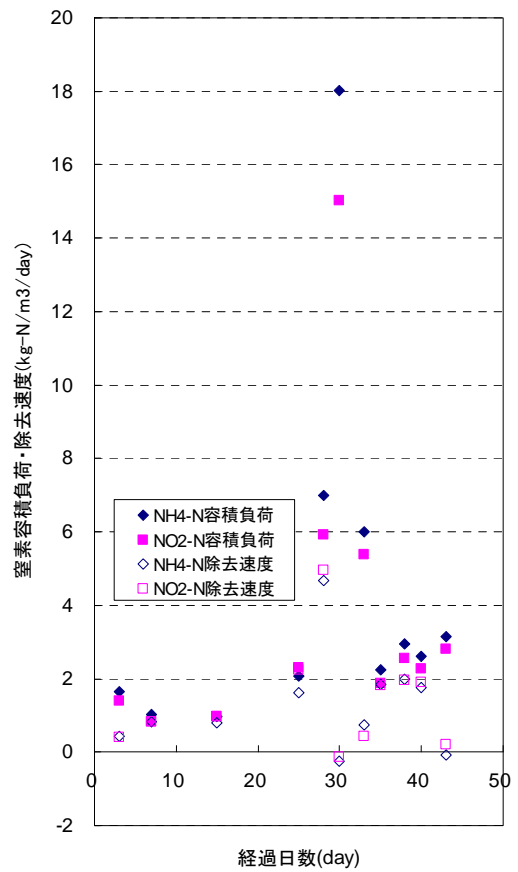


図 3.31 人工基質系の窒素除去速度の経日変化

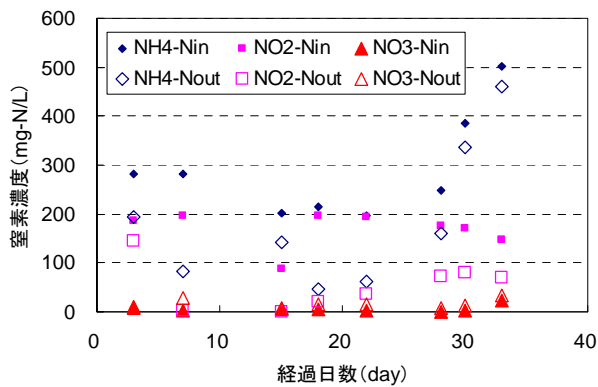


図 3.32 懸濁態脱離液系の窒素濃度の経日変化

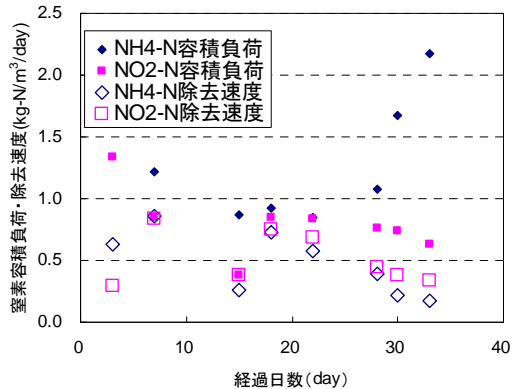


図 3.33 懸濁態脱離液系の窒素除去速度の経日変化

NH₄-N 消費量に対する NO₂-N 消費量および NO₃-N 生成量のモル比

図 3.34~3.37 に各リアクターにおける NH₄-N 消費量に対する NO₂-N 消費量および NO₃-N 生成量のモル比を示す。

人工基質系であるのモル比に着目すると、おおよそ 1 : 1~1 : 1.2 の範囲で NH₄-N と NO₂-N の同時除去が行われており、NO₃-N も NH₄-N : NO₃-N において 0.15 程度生成されている。ANAMMOX 反応による理論比は NH₄-N(removal) : NO₂-N(removal) : NO₃-N(product) = 1 : 1.32 : 0.26 であり、おおよそ ANAMMOX 反応に近い反応比において窒素除去が行われたことが確認できる。また、30 日および 33 日においてモル比が他期間と異なることについては、窒素除去が完全に停止したあるいは、NO₂-N 除去率が 10 % 以下となった期間であったためであると考えられ、除去率が低下すると、反応のモル比のバランスが崩れやすいことがわかった。

また、脱離ろ液系のモル比に着目すると、脱離液 100 % に変更から数週間において反応のモル比のバランスが崩れる傾向にあった。このことはやはり、脱離液 100 % に変更後、窒素除去率が低下したことが原因であると考えられる。窒素除去率低下期間以外については安定したモル比を維持していた。

また、懸濁態脱離液系では、運転から 3 日目においてモル比が異なるが、この期間も窒素除去率低い期間である。しかし、その後 NO₂-N 除去率はほぼ 100 % となったことから、7 日目においてモル比は人工基質系と同等の数値を得られた。また、その後窒素除去率が下降してきたが、徐々に NO₂-N の消費量が増加し、30, 33 日目には NH₄-N : NO₂-N = 1 : 1.8 となる程 NO₂-N の消費量が増加した。

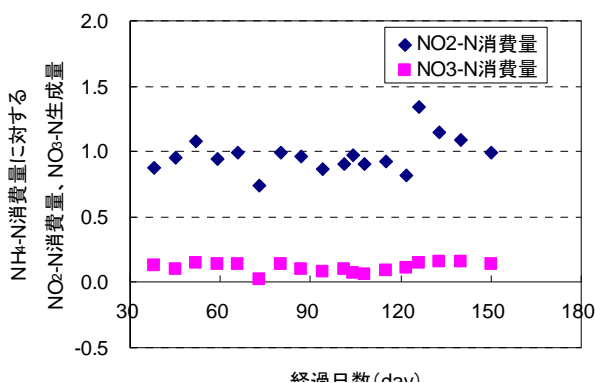


図 3.34 人工基質系のモル比の経日変化

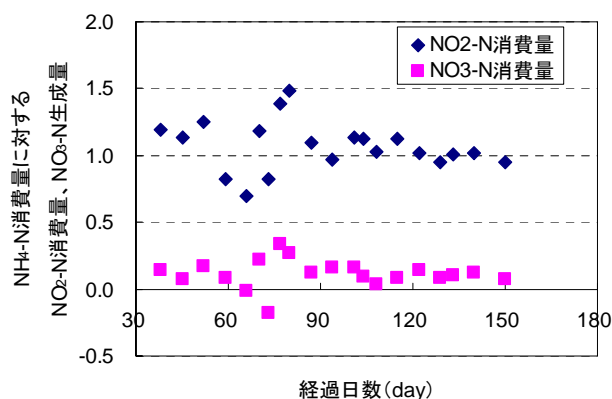


図 3.35 脱離ろ液系のモル比の経日変化

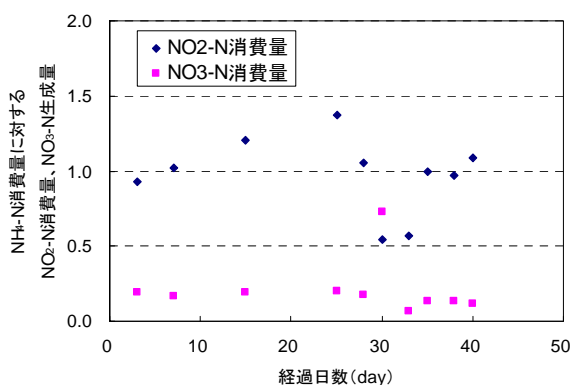


図 3.36 人工基質系のモル比の経日変化

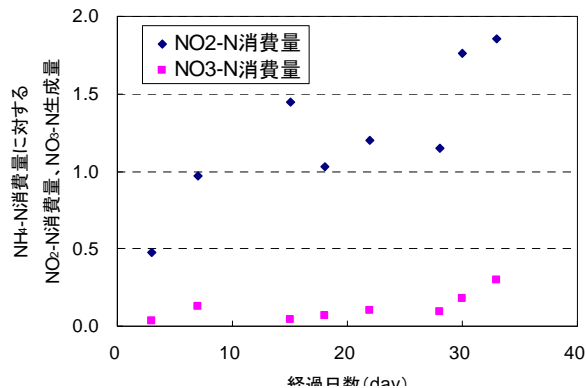


図 3.37 懸濁態脱離液系のモル比の経日変化

窒素除去速度に及ぼす影響の検討

図 3.38 および図 3.39 に人工基質および溶存態脱離液馴致リアクターにおける $\text{NO}_2\text{-N}$ および T-N の容積負荷と窒素除去速度を示す。

これは、両リアクターともに槽内汚泥量および流出汚泥速度が一定となり、かつ一定の窒素容積負荷に対して一定の窒素除去速度が得られた期間である運転日数 136～150 日における結果である。

この結果から、両リアクターにおいて制限基質となる $\text{NO}_2\text{-N}$ はほぼ 100 %の除去率を示したことから、今回与えた窒素容積負荷の範囲においては溶存態脱離液馴致された場合においても窒素除去速度は低下することはなかった。

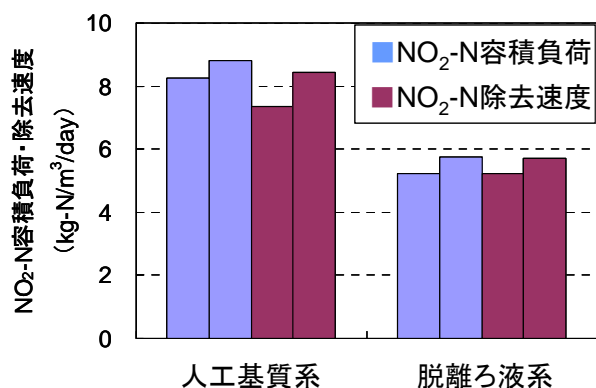


図 3.38 馴致リアクターにおける $\text{NO}_2\text{-N}$ 容積負荷および除去速度

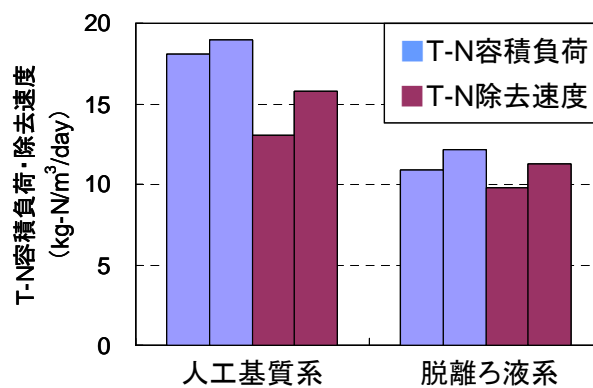
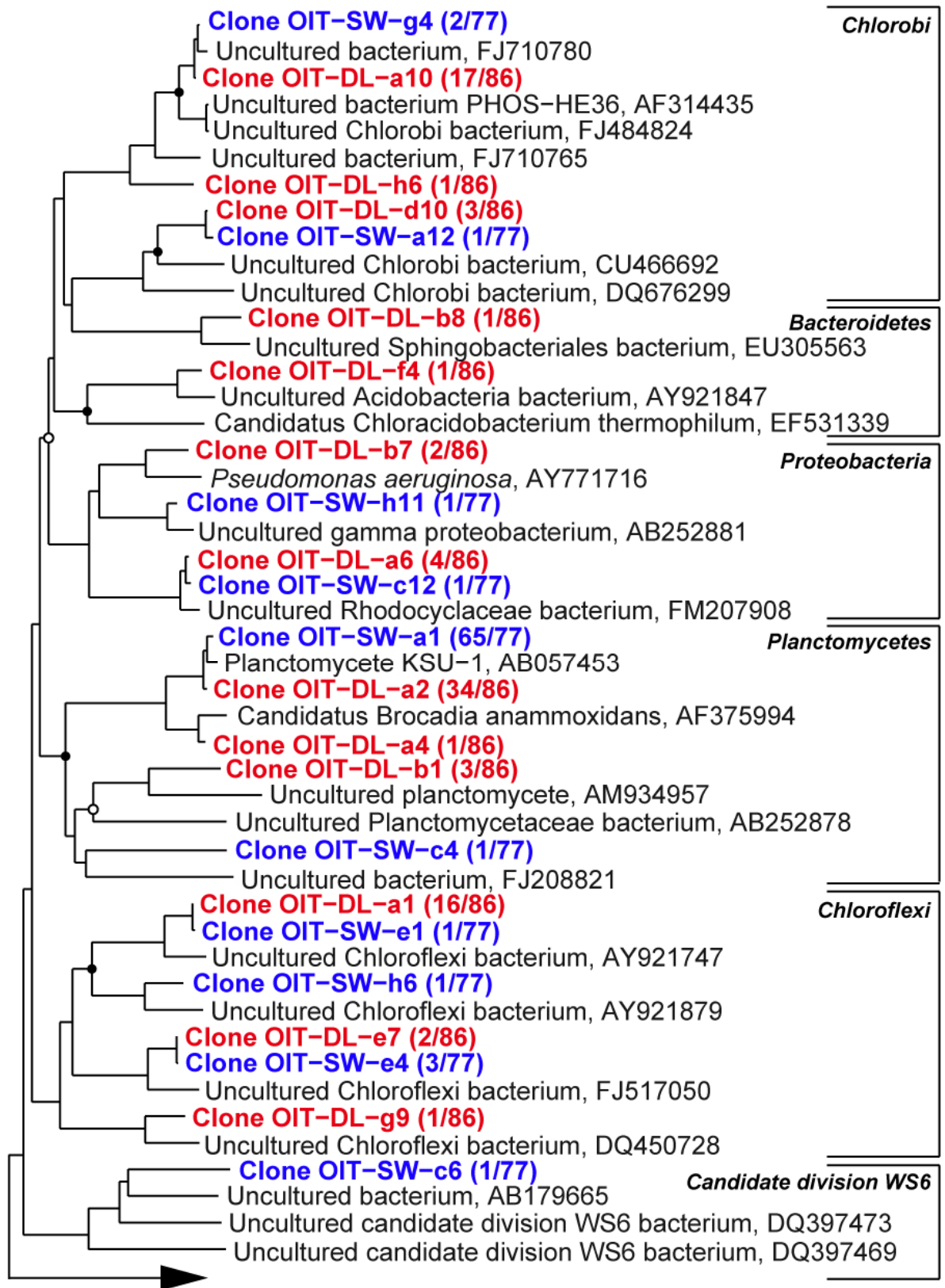


図 3.39 馴致リアクターにおける T-N 容積負荷および除去速度

16SrRNA 系統解析

図 3.40 にリアクター内に存在する ANAMMOX 細菌のクローン解析結果を示す。

図中の clone OIT-SW は人工基質系汚泥から検出されたクローンで、clone OIT-DL は脱離ろ液系汚泥から検出されたクローンである。ANAMMOX 細菌は Planctomycetes 網に属しており、検出されたクローン結果から判断すると、人工基質系では 84 %が ANAMMOX 菌、脱離ろ液系では 44 %が ANAMMOX 菌という結果となり、脱離ろ液系の ANAMMOX 菌の存在割合が相対的に低い結果となった。



0.1

図3.40 リアクター内に存在するANAMMOX細菌のクローン解析結果()内は検出されたクローン数を示す。

人工基質馴致汚泥と脱離液脱離液馴致汚泥の ANAMMOX 活性の検討

図 3.41 に最大比 T-N 除去速度による ANAMMOX 活性の比較を示す。回分実験の結果から、人工基質馴致汚泥系および脱離液脱離液馴致汚泥系の最大比 T-N 除去速度はそれぞれ、0.172 (g-N/g-SS/day)、0.127 (g-N/g-SS/day) となり、脱離液脱離液馴致汚泥系の最大比 T-N 除去速度の方が 25 % 低い結果となった。このことから、脱離液脱離液系の方が ANAMMOX 活性は約 25 % 低いことが示唆され、この結果は 16SrRNA 系統解析結果から裏付けることができるであろうと考える。

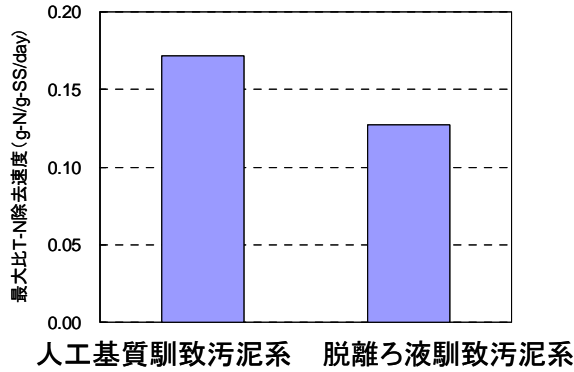


図3.41 最大比T-N除去速度によるANAMMOX活性の比較

懸濁態脱離液 (500µm 透過後) を供給した際の窒素除去速度の検討

図 3.42 に懸濁態脱離液供給による NH₄-N および NO₂-N 除去速度と NO₃-N 生成速度の変化を示す。ここで、嫌気条件下において NH₄-N は ANAMMOX 反応のみにて除去されると仮定できるとする。

図から、懸濁態脱離液供給 33 日間で NH₄-N 除去速度は 0.86 kg-N/m³/day から 0.18 kg-N/m³/day まで低下した。このことから、懸濁態脱離液供給によって ANAMMOX 反応が低下することがわかった。しかし、この低下の原因は槽内汚泥量の減少によるものなのか、懸濁物質による阻害なのかの判断まではできなかった。また、NH₄-N 除去速度と NO₂-N 除去速度の低下は NO₂-N 除去速度の低下の方が緩い勾配で進行した。このことから、ANAMMOX 反応とともに従属栄養脱窒反応による NO₂-N の消費が起こった可能性が高い。

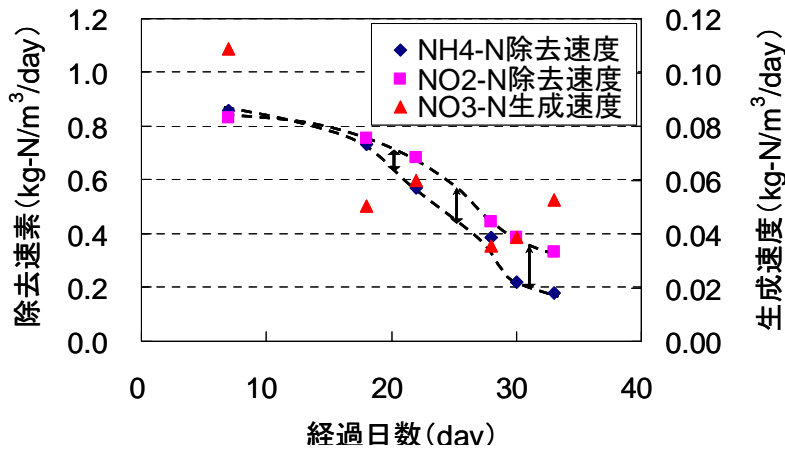


図 3.42 懸濁態脱離液供給による NH₄-N および NO₂-N 除去速度と NO₃-N 生成速度の変化

人工基質および脱離液を供給したリアクターにおける窒素除去当たりの N₂O 転換率の算出と N₂O 発生傾向の検討

図 3.48 に処理水 NO₂-N 濃度と窒素除去当たりの N₂O 転換率の関係を示す。

この関係を見ると、人工基質系において、槽内の NO₂-N 濃度が高くなると N₂O 転換率が高くなる傾向に

あった。Marlies J. Kampschreurらの下水処理における N_2O 発生のレビュー^{3,4)}によると、脱窒プロセスにおいてC/N比が低い場合に N_2O の発生量が増加すると言われているが、16SrRNA系統解析の結果では、人工基質馴致リアクターにおいてANAMMOX細菌の馴致度が非常に高く、確認された範囲内では脱窒菌も確認されなかったことから、はっきりとしたことは言えないが、C/N比が低くなると(窒素濃度が高くなると)、ANAMMOX菌馴致リアクターにおいても N_2O の発生量が増加することが考えられる。

ただし、既報によると、部分亜硝酸化-ANAMMOXプロセス(人工基質供給)におけるANAMMOXリアクターからの窒素除去当たりの N_2O 転換率は0.6%とされている。本実験での人工基質馴致リアクターでは、0.03~0.23%の転換率であったことから、本実験の方が低い N_2O 転換率であった。

また、懸濁態脱離液系の N_2O 転換率は0.13~0.82%であり、人工基質系よりも懸濁態脱離液系の方が N_2O 転換率は高いという結果となった。

懸濁態脱離液系においても槽内 NO_2-N 濃度に影響を受けているであろうが、それ以上に懸濁態脱離液供給によって変化したことが N_2O 転換率を高めた原因であると考えられる。前述したように、懸濁態脱離液系では従属栄養脱窒反応が起こった可能性が高いことから、この反応において N_2O を生成した可能性は高い。

ただし、図3.43、3.44に NO_2-N/NH_4-N 比と窒素除去当たりの N_2O 転換率の関係を示すが、従属栄養脱窒反応による NO_2-N 除去量の増加に伴って、 N_2O 転換率は直線的な増加を示していないことから、従属栄養脱窒反応増加による N_2O 転換率増加の可能性は高い。

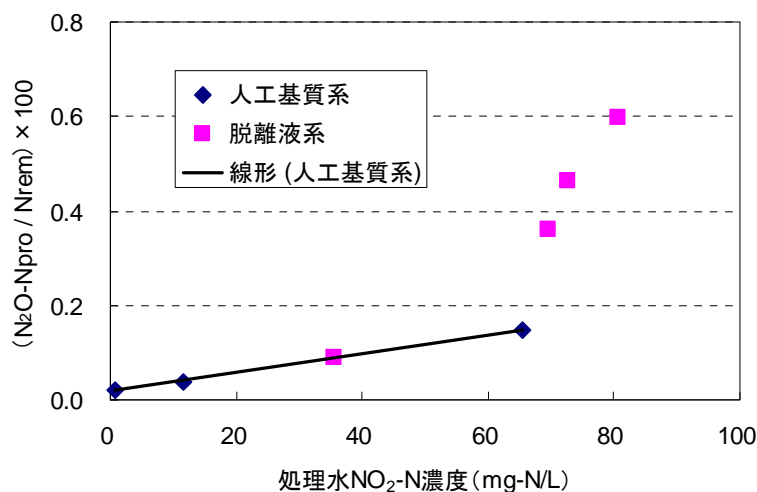


図 3.43 処理水 NO_2-N 濃度と窒素除去当たりの N_2O 転換率の関係

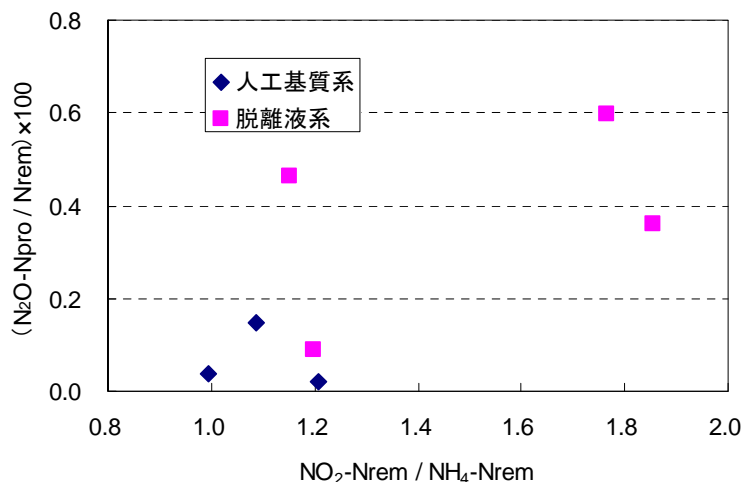


図 3.44 NO_2-N / NH_4-N 比と窒素除去当たりの N_2O 転換率の関係

本節において得られた知見を以下に示す。

1) 脱離液のみを連続供給すると、NO₂-N 除去速度は3週間後に一度約50%にまで低下するが、その後約3カ月後に概ね80%以上にまで回復し、脱離液によって馴致された。

2) ANAMMOX リアクターへの脱離液供給による窒素除去性能に及ぼす影響を検討した結果、上向流型リアクターにおいて人工基質および溶存態脱離液(0.45μm 透過後)によって馴致された場合では、どちらも制限基質となるNO₂-Nの除去率はほぼ100%を維持する結果となったことから、今回与えた窒素容積負荷(12 kg-N/m³/day)の範囲においては溶存態脱離液供給によって窒素除去性能は変化しなかった。さらに、NH₄-N消費量に対するNO₂-N消費量およびNO₃-N生成量のモル比においては、人工基質系では、NH₄-N : NO₂-N : NO₃-N = 1 : 1.04 : 0.13となり、溶存態脱離液系では、1 : 0.98 : 0.09となり、反応比は同等の結果となったことから、両リアクターの窒素除去性能はかわらないと判断できる。

3) ANAMMOX リアクターへの脱離液供給によるグラニューールに及ぼす影響を検討した結果、上向流型リアクターにおいて人工基質および溶存態脱離液(0.45μm 透過後)によって馴致された場合では、人工基質系では96日、溶存態脱離液系では107日となり、変化はなかった。しかし、両リアクターのグラニューールに対して16SrRNA 系統解析を行った結果、ANAMMOX 菌の存在率は人工基質系では84%、溶存態脱離液系では44%となり、溶存態脱離液系の存在率の方が低い結果となった。

4) また、回分実験により、人工基質馴致汚泥と溶存態脱離液馴致汚泥のANAMMOX 活性を検討し、両汚泥の供試水に人工基質を用い動力学定数の算出を行った結果、最大比 T-N 除去速度は人工基質馴致汚泥系では0.172 g-N/g-SS/dayとなり、溶存態脱離液馴致汚泥系では0.127 g-N/g-SS/dayとなったことから、溶存態脱離液系の方がANAMMOX 活性は約25%低いことが示唆された。この結果は16SrRNA 系統解析結果から裏付けることができるであろうと考える。

5) 槽型リアクターにおいて懸濁態脱離液(500μm 透過後)を供給した場合では、運転から33日間でNH₄-N 除去速度は0.86 kg-N/m³/day から0.18 kg-N/m³/day まで低下した。この低下の原因は槽内汚泥量の減少なのか、懸濁物質による阻害なのかの判断まではできなかった。

阻害因子の検討

1) NO₂-N 濃度による影響

2) 共存有機酸が及ぼす影響 について検討を行った。

1) NO₂-N 濃度による影響

人工基質供給下の上向流型、槽型および回分型リアクターから得られたデータを基にNO₂-N 濃度による影響を検討する。実験装置は図 3.22 に示す上向流型リアクター、図 3.23 に示す槽型リアクターおよび回分型リアクターを用いた。

上向流型におけるNO₂-N 濃度による影響

人工基質供給下において上向流リアクターでは、流入NO₂-N 濃度を380 mg-N/L(窒素容積負荷:26 kg-N/m³/day)とした際、初めの1週間はNO₂-N 除去率はほぼ100%であったが、その後32日間でNO₂-N 除去率は60%にまで低下した。このような、除去速度の低下は一般的に基質以外の物質が供給されることによる阻害が考えられるが、ここでは、基質濃度を増加させただけであり、阻害物質は供給していない。

既報によると、流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が 300 mg-N/L 以上になると窒素除去速度が低下するという知見があり、その他にも ANAMMOX リアクター運転時における $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の障害が様々に報告されている^{3,5), 3,6)}ことから、ANAMMOX リアクター特有の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度 (基質濃度) による障害が起こったと考えられる。また、流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度を 300 mg-N/L とすると、条件変更から 13 日間 $\text{NO}_2\text{-N}$ は 90 % 以上の除去率を示したことから、既報と合わせると、流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度 300 mg-N/L までの濃度においては $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度による障害は起こらないと考えられる。

また、図 3.45 に流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度と $\text{NO}_2\text{-N-SS}$ 負荷・除去速度の関係を示す。 $\text{NO}_2\text{-N-SS}$ 負荷・除去速度の算出に用いた MLSS 濃度は運転日数 118 日目の数値 (24900 mg-SS/L) である。また、この MLSS 濃度は (汚泥充填密度×汚泥充填体積) / リアクター容積から算出した推定値である。この結果からもわかるように、上向流型の流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度を 380 mg-N/L とすると、除去速度が低下している。

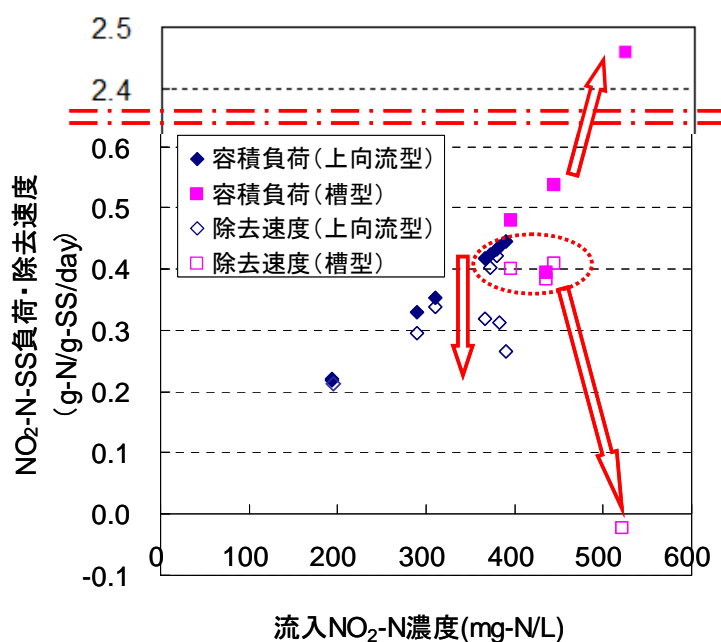


図 3.45 流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度と $\text{NO}_2\text{-N-SS}$ 負荷・除去速度の関係

槽型における $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度による影響

槽型リアクターにおいて、流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が 300 mg-N/L 以上を供給する実験を行った。図 4-7-1 の流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度と $\text{NO}_2\text{-N-SS}$ 負荷・除去速度の関係から、流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度 400 mg-N/L 以上においても $\text{NO}_2\text{-N-SS}$ 負荷が $0.40 \sim 0.54 \text{ g-N/g-SS/day}$ では、 $\text{NO}_2\text{-N-SS}$ 除去速度が約 $0.40 \text{ g-N/g-SS/day}$ と一定であったが (MLSS 濃度は運転終了時の乾燥重量から算出した数値 4762 mg-SS/L を使用)、 $\text{NO}_2\text{-N-SS}$ 負荷を 2.5 g-N/g-SS/day (流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度 522 mg-N/L) とすると、反応が完全に停止した (MLSS 濃度は 33 日目の汚泥流出前の推定値 6120 mg-SS/L を使用)。これが意味することは流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度 300 mg-N/L 以上においても処理可能であるが、SS 負荷が高すぎると処理しきれずに、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が高濃度にリアクター内に蓄積してしまうことから、SS 当たりに除去しうる程度の容積負荷を与えることが重要となることがわかった。

また、運転期間 35～43 日においてリアクター内に $\text{NO}_2\text{-N}$ を残留させ、槽内 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度がどの付近において窒素除去速度が低下するのかを検討した。

35～40 日においては槽内に $10 \sim 100 \text{ mg-N/L}$ の $\text{NO}_2\text{-N}$ を残留させても高い除去速度を得られていたが、43 日において反応が完全に停止した。

ここで、図 3.46 に処理水 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度と比 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去速度の関係を示すが、運転期間 35～43 day の 8 日間で MLSS が 4762 mg-SS/L で一定であると仮定した場合、槽内 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度に関わらず、比 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去速度は一定となったことから、槽内 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が 10 mg-N/L 以上においては、0 次反応となることがわ

かり、第3章における回分実験の結果と一致した。このことから、43日に反応が完全に停止した際に、槽内のNO₂-N濃度がどの付近になると低下するのかをシミュレーションした。今回の槽型リアクターでの実験における物質収支式は(式1)のように表わすことができる。

$$V \cdot \frac{d(\text{NO}_2\text{-N})}{dt} = Q_{in} \cdot (\text{NO}_2\text{-N})_{in} - Q_{out} \cdot (\text{NO}_2\text{-N})_{out} - V \cdot k \cdot X \quad (Q_{in} = Q_{out}) \quad \dots(\text{式1})$$

この(式1)に、表3.14に示す運転日数43日目のデータ数値を代入すると、(NO₂-N)_{out}つまり、処理水NO₂-Nは160 mg-N/Lとなる。つまり、槽内のNO₂-N濃度が160 mg-N/Lとなったことによって、除去速度が低下した可能性が高いことが示唆された。

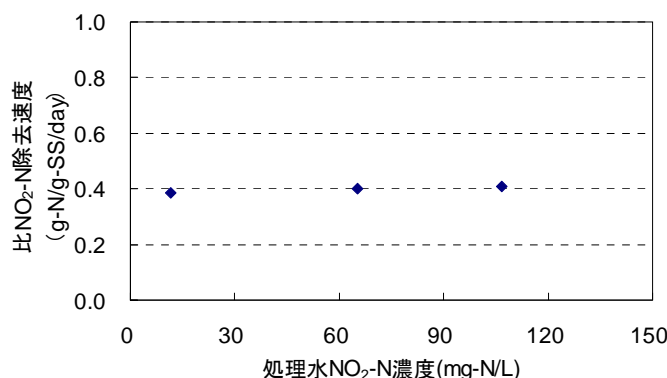


表 3.14 運転日数 43 日目のデータ数値

(NO ₂ -N) _{in} (mg-N/L)	488
Q _{in} (L/day)	0.576
V (L)	0.10
k (1/day)	0.398
X (mg/L)	4762

図 3.46 処理水 NO₂-N 濃度と比 NO₂-N 除去速度の関係

2) 共存有機酸が及ぼす影響

供試水の供給条件は、運転終了時の供試水中に酢酸 Na を所定濃度添加した液を各 4 台のリアクターに供給した。各 4 台のリアクターへの酢酸供給濃度はそれぞれ、0, 50, 100, 200 mg-C/L と設定した。図 3.47 に脱離液酢酸供給実験概要図を示す。

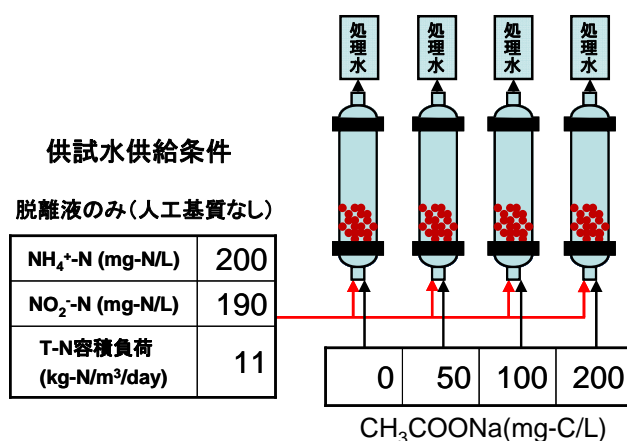


図 3.47 脱離液酢酸供給実験概要図

各室素濃度の経日変化

図 3.48～3.51 に各リアクターにおける各室素濃度の経日変化を示す。また、基質調整瓶内からリアクターに流入するまでに各態室素が消失していることから流入の各室素濃度はリアクター流入直前で測定した結果と基質調整瓶内で測定した結果を示している。

酢酸を供給しなかったリアクターでは 10 %に満たない全室素除去率を運転期間中示していた。この原因としては、混合比変化系 RUN 4 の条件において、運転終了時の NO₂-N 除去率は 95 %を示していた。

その汚泥を4本のリアクターに均等に分注し、RUN 4の条件の窒素負荷を与えたため、窒素負荷に対して除去が追い付かず 90%が処理水に流出したと考えられる。この結果は、このリアクターにおいて ANAMMOX 反応がほとんど起こっていなかったことを意味し、酢酸供給系の対照系となるこのリアクターにおいて ANAMMOX 反応がほとんど起こっていないということは、酢酸供給系においても ANAMMOX 反応がほとんど起こっていないと考えられる。

しかし、酢酸を供給した系では $\text{NH}_4\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ が除去されている。特に、どの酢酸濃度の系においても $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率が $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去率よりも高くなり、酢酸濃度が高くなるにつれて、 $\text{NH}_4\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率が高くなる傾向が見てとれる。また、酢酸供給系においてリアクターに流入するまでに各態窒素が消失していることも、リアクター流入以前に同様の反応が起こった可能性が高い。このことから、酢酸供給系の各リアクターにおいて基質調整瓶内での各態窒素濃度を測定し、そこから流出口までの各窒素除去率を算定した。供給酢酸濃度 50 mg-C/L の系では $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率ともに約 25%、100 mg-C/L 供給系では $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率それぞれ約 45%、75%、200 mg-C/L 供給系では $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率それぞれ約 50%、100%であった。このように、酢酸供給濃度の増加に伴い $\text{NH}_4\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率は上昇し、その各窒素除去率の上昇の仕方にも差が表れ、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去率の上昇の方が高かった。

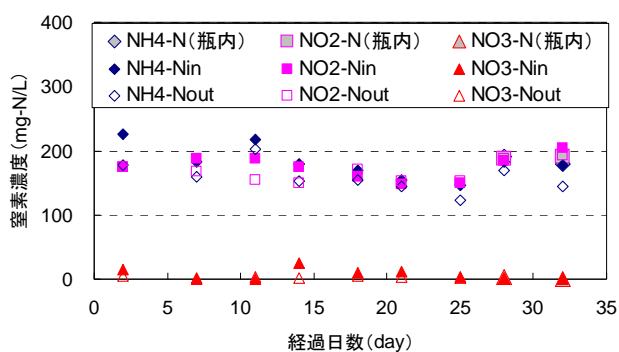


図 3.48 供給酢酸濃度 0 mg-C/L のリアクターの窒素濃度の経日変化

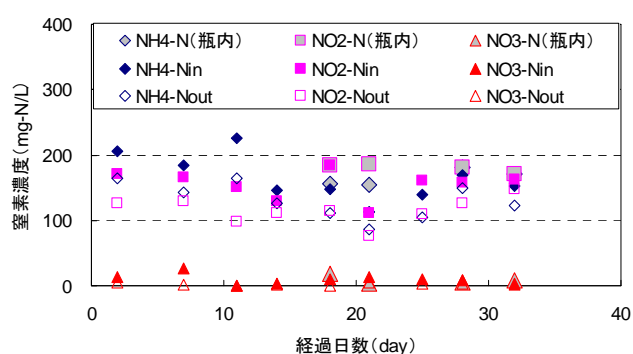


図 3.49 供給酢酸濃度 50 mg-C/L のリアクターの窒素濃度の経日変化

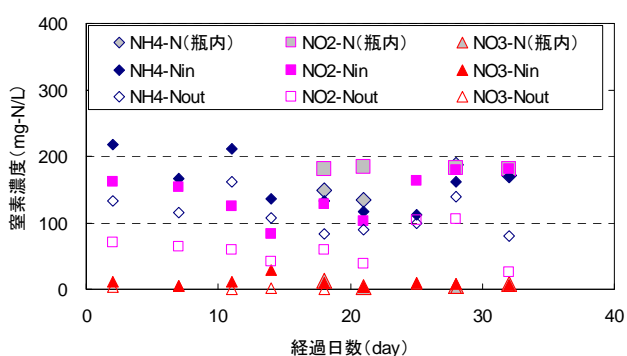


図 3.50 供給酢酸濃度 100 mg-C/L のリアクターの窒素濃度の経日変化

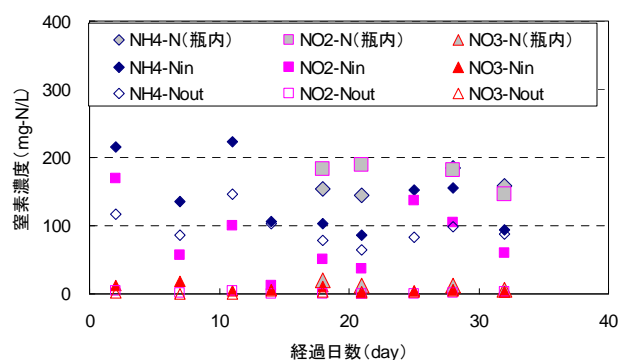


図 3.51 供給酢酸濃度 200 mg-C/L のリアクターの窒素濃度の経日変化

酢酸濃度の経日変化

図 3.52～図 3.55 に各リアクターにおける酢酸濃度の経日変化を示す。酢酸濃度については運転開始当初から基質調整瓶内の酢酸濃度を測定した。まず、酢酸を供給しなかったリアクターでは流入、流出ともに酢酸が検出されなかった。このことは、脱離液 (0.45 μm 透過後) 中には有機酸が含まれていないことを意味する。また、その他酢酸を供給した系において、基質調整瓶内からリアクター流入までの間で酢酸が

一部消失した。さらに、基質調整瓶内の酢酸濃度は設定した酢酸濃度に近い時もあれば、設定値より 50～150 mg-C/L 低い場合もある。これらのことは、供試水を供給するチューブの中に付着していた細菌およびチューブから剥離し基質調整瓶内に流出した細菌が、酢酸を消費したことが予想される。また、全てのリアクターにおいて処理水中から酢酸はほぼ完全に消失しており、細菌による除去が行われたことが示唆された。

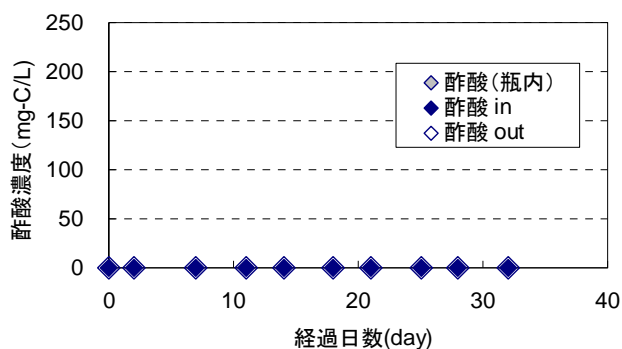


図 3.52 供給酢酸濃度 0 mg-C/L のリアクターの酢酸濃度の経日変化

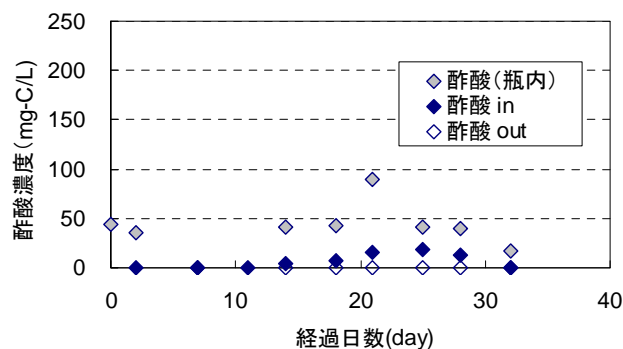


図 3.53 供給酢酸濃度 50 mg-C/L のリアクターの酢酸濃度の経日変化

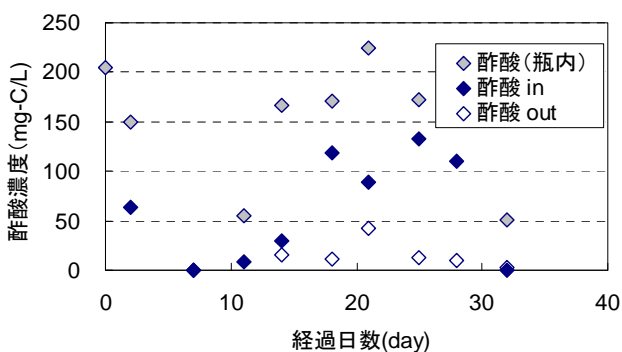


図 3.54 供給酢酸濃度 100 mg-C/L のリアクターの酢酸濃度の経日変化

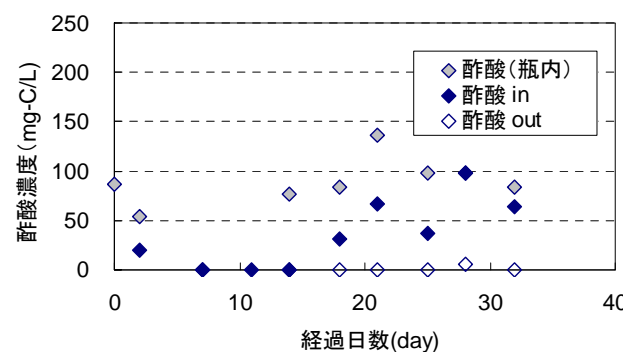


図 3.55 供給酢酸濃度 200 mg-C/L のリアクターの酢酸濃度の経日変化

窒素および酢酸容積負荷と除去速度の経日変化

図 3.56～図 3.59 に各リアクターにおける窒素・酢酸容積負荷と除去速度の経日変化を示す。ここで示す窒素・酢酸容積負荷および除去速度は、基質調整瓶内からリアクター流出口までの間の容積値を用いて算出している。その理由としては、基質調整瓶からリアクターに流入するまでの間とリアクター流入から流出までの間では同様の窒素・酢酸除去反応が起こっていることが考えられ、基質調整瓶内から流出口全体までの間の除去を考慮するべきと考えたためである。そこで、リアクター容積は以下のものを用いた。

$$\begin{aligned} & \text{(基質調整瓶内～リアクター流入前)の容積} + \text{ガラスカラム容積} \\ & = 6.5 + 13.2 = 19.7(\text{mL}) \end{aligned}$$

まず、酢酸を供給しなかった系においては、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ ともにほとんど除去が行われなかった。また、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 容積負荷の平均値はそれぞれ、3.52、3.60 $\text{kg-N/m}^3/\text{day}$ となり、除去速度の平均値はそれぞれ、0.54、0 $\text{kg-N/m}^3/\text{day}$ となった。

また、その他酢酸を供給した系においては、供給設定酢酸濃度 50 mg-C/L の系では、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 容積負荷の平均値はそれぞれ、3.14、3.44 $\text{kg-N/m}^3/\text{day}$ となり、除去速度の平均値はそれぞれ、0.91、1.23 $\text{kg-N/m}^3/\text{day}$ となった。また、酢酸容積負荷の平均値は 0.90 $\text{kg-C/m}^3/\text{day}$ となり、除去速度の平均値は

0.90 kg-C/m³/day となった。

また、供給設定酢酸濃度 100 mg-C/L の系では、NH₄-N、NO₂-N 容積負荷の平均値はそれぞれ、3.05、3.46 kg-N/m³/day となり、除去速度の平均値はそれぞれ、1.19、2.37 kg-N/m³/day となった。また、酢酸容積負荷の平均値は 1.90 kg-C/m³/day となり、除去速度の平均値は 1.88 kg-C/m³/day となった。

また、供給設定酢酸濃度 200 mg-C/L の系では、NH₄-N、NO₂-N 容積負荷の平均値はそれぞれ、3.06、3.51 kg-N/m³/day となり、除去速度の平均値はそれぞれ、1.52、3.50 kg-N/m³/day となった。また、酢酸容積負荷の平均値は 3.60 kg-C/m³/day となり、除去速度の平均値は 3.20 kg-C/m³/day となった。

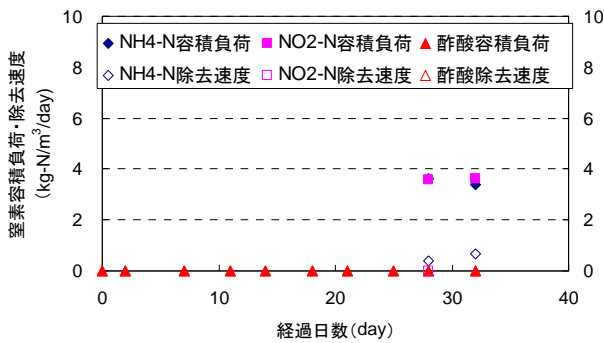


図 3.56 供給酢酸濃度 0 mg-C/L の窒素・酢酸容積負荷と除去速度の経日変化

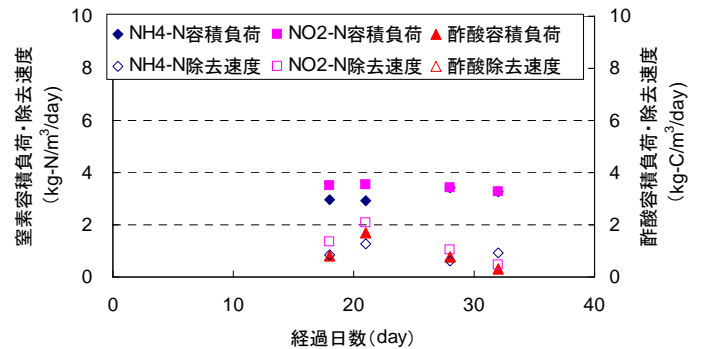


図 3.57 供給酢酸濃度 50 mg-C/L の窒素・酢酸容積負荷と除去速度の経日変化

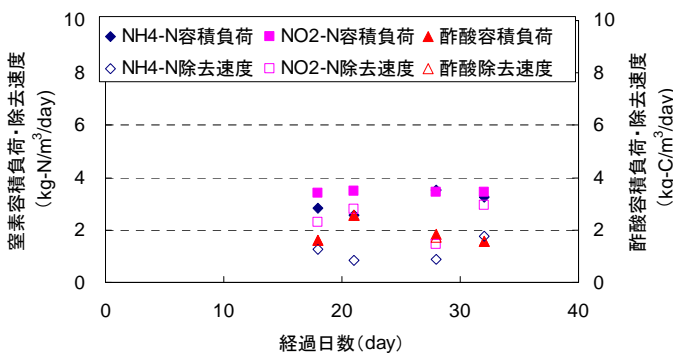


図 3.58 供給酢酸濃度 100 mg-C/L の窒素・酢酸容積負荷と除去速度の経日変化

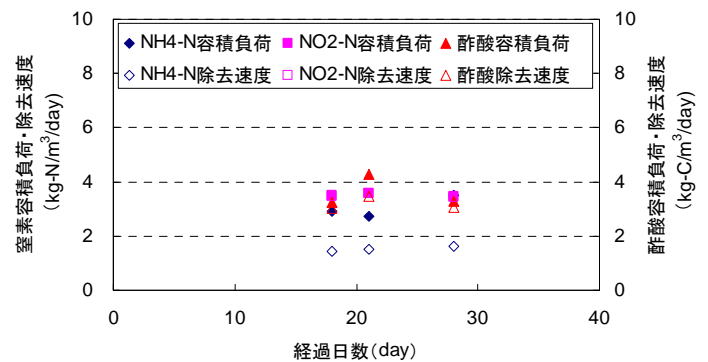


図 3.59 供給酢酸濃度 200 mg-C/L の窒素・酢酸容積負荷と除去速度の経日変化

共存有機酸が及ぼす影響検討

図 3.60 に供給酢酸濃度と各窒素・酢酸除去速度との関係について示す。

また、リアクター流入前において窒素成分および酢酸の除去が行われていたことから、基質調整瓶内からリアクター流出口までを反応場と見なした。そのため、各種除去速度の算出においては基質調整瓶内の各種濃度を測定した分しか算出を行っていない。

図において円で囲っている意味としては、リアクター別に分けている。各リアクターとも供給設定酢酸濃度と相違の酢酸濃度になっているところもあるが、その場合においても図中にプロットしてある。また、リアクターごとに供給酢酸濃度と各窒素・酢酸除去速度の平均値をとった図を図 3.61 に示す。図を見ても明らかに、供給酢酸濃度の増加に伴い、各窒素・酢酸除去速度が上昇している。

まず、酢酸を供給しなかった系では 10% に満たない全窒素除去率となった。これは、MLSS に対する窒素負荷が高かったため、窒素負荷に対して除去が追い付かず 90% が処理水に流出したと考えられる。また、酢酸を供給すると、酢酸濃度の上昇とともに NO₂-N と酢酸除去速度が NH₄-N 除去速度に比べ、急勾

配で上昇した。酢酸を消費し、 $\text{NO}_2\text{-N}$ を除去する過程は ANAMMOX と同じ嫌気場で起こる反応である従属栄養脱窒が考えられ、今回の供給設定酢酸濃度では、従属栄養脱窒反応による脱窒素の方が ANAMMOX 反応による脱窒素よりも多かったと考えられる。また、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 除去速度が供給設定酢酸濃度 200 mg-C/L となった時は勾配が緩くなっているが、これは供給した $\text{NO}_2\text{-N}$ を完全に除去してしまっている状態であるので、供給した $\text{NO}_2\text{-N}$ 以上の量を供給すれば、除去される可能性はあった。

また、 $\text{NH}_4\text{-N}$ については酢酸濃度が 50 mg-C/L 増加するごとに除去速度が約 $0.3 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ 上昇する傾向が見られた。このことは、栗田らが行った回分試験による有機物質が ANAMMOX プロセスに及ぼす影響の検討において、酢酸は ANAMMOX 細菌のアンモニア除去に阻害影響を与えず、逆にアンモニア除去速度を約 10% 増加させたという知見^{3,7)}が示すように、酢酸が ANAMMOX 活性の向上にわずかながら関与することを示している。

しかし、今回の検討では、ANAMMOX 反応による窒素除去がほとんど起こらなかったことから、従属栄養脱窒反応による窒素除去が増加してしまっただが、ANAMMOX 反応によって、窒素負荷のほとんどを除去するような状況であれば、従属栄養脱窒反応による脱窒素が ANAMMOX 反応による脱窒素を勝るといようなことはなくなるはずである。

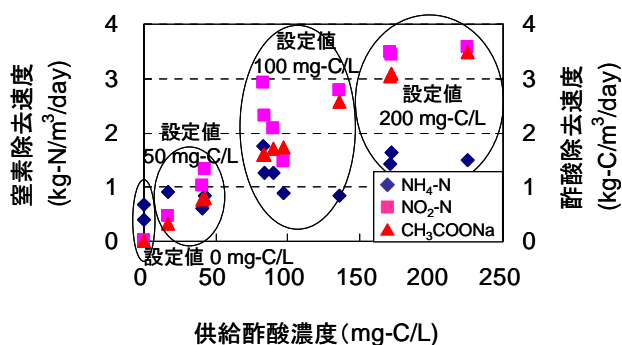


図 3.60 供給酢酸濃度と各窒素・酢酸除去速度との関係

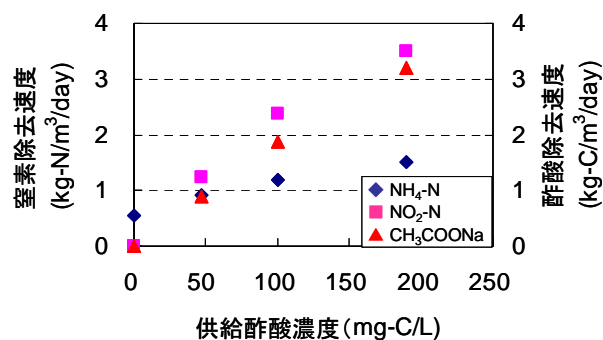


図 3.61 供給酢酸濃度と各窒素・酢酸除去速度との関係(平均)

ANAMMOX プロセスに対する阻害因子の影響を明らかとすることを目的とし、幾つかの検討を行った。得られた知見を以下に示す。

- 1) 本実験による結果と既報を合わせると、上向流型においては流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度 300 mg-N/L 以上において阻害が起こる可能性が高いことが示唆された。
- 2) 槽型においては流入 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度 300 mg-N/L 以上においても処理可能であるが、容積負荷が高すぎると処理しきれずに、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が高濃度にリアクター内に蓄積してしまうことから、SS 当たりに除去しうる程度の容積負荷を与えることが重要となることがわかった。また、槽内 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が 160 mg-N/L となる条件において、阻害を受け窒素除去速度は低下することが示唆された。
- 3) 回分型においては、人工基質馴致系および脱離ろ液馴致系ともにリアクター内の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が 140 mg-N/L 以上となると $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度による阻害が現れることが示唆された。
- 4) 有機酸による影響について検討した結果、酢酸濃度が 50 mg-C/L 高いと $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去速度が約 $0.3 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ 上昇した。嫌気条件下での $\text{NH}_4\text{-N}$ 除去は ANAMMOX 反応のみと考えられることから、酢酸が ANAMMOX 活性の向上にわずかながら関与することが示唆された。

参考文献

- 3.1) Kartal et al., 2008. FEMS Microbiology Ecology, 63(1), pp.859-865.
- 3.2) Kieling et al., 2007. Process Biochemistry, 42, pp.1579-1585.
- 3.3) Okabe et al, 2004. Microbes and Environments, 70, pp.83-98.
- 3.4) Marlies et al. 2009. Water Research, 43, pp. 4093-4103.
- 3.5) 山岸昂夫ら, 2009, 水環境学会年会講演集, Vol.43, pp344
- 3.6) 木村裕哉ら, 2009, 水環境学会年会講演集, Vol.43, pp347
- 3.7) 栗田貴宣ら, 2009, 環境工学研究論文集, Vol.46, pp.681-688.

8. 研究成果の刊行に関する一覧表

2007 年度

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
第 42 回日本水環境学会年会「Nitrogen removal performance of an up-flow granular bed anammox reactor	2008 年 3 月 19 日	日本水環境学会	曹順子、藤井直基、佐藤 久、岡部 聡
第 42 回日本水環境学会年会「メタン発酵消化液への適用を想定した ANAMMOX リアクター操作因子の基礎的検討」	2008 年 3 月 19 日	日本水環境学会	米田貴久、笠原伸介、石川宗孝、北尾高嶺
Proceedings of IWA Biofilm Technologies Conference「Microbial community structure and in situ microbial activities in anaerobic granules as determined by the combined use of microelectrodes and molecular techniques.」	2008 年 1 月 8 日	International Water Association	Satoh H., Miura Y., Tsushima I., and Okabe S.
第 4 回環境ソリューションシンポジウム「ANAMMOX リアクターの構築と窒素除去能力の検討」	2008 年 1 月 8 日	大阪工業大学	米田貴久、笠原伸介
Proceedings of International Conference on Civil and Environmental Engineering ICCEE-2007「Analysis of microbial interaction in ANAMMOX reactors.」		広島大学	Yuri, S. Kindaichi, T. Ozaki N.

2008 年度

論文以外の紙上発表 月刊「水」Vol.50-10、(No.720)「水系生物膜内の微生物活性解析への微小電極の適用」	2008 年 8 月	月刊「水」発行所	佐藤久、岡部聡.
口頭発表 環境バイオテクノロジー学会「有機性廃棄物からのポリヒドロキシアルカン酸の生産」	2008 年 6 月	環境バイオテクノロジー学会	佐藤久、坂井田健司、岡部聡、渡辺義公.

平成 20 年度土木学会全国大会「脱気膜を用いたメタン発酵プロセスにおける高効率ガス回収」	2008 年 9 月	土木学会	佐藤久、高橋慶多、深澤達矢、高橋正宏、岡部聡、中原禎仁、笹川学.
平成 20 年度土木学会全国大会「ANAMMOX グラニュールの物理的性質および機能」	2008 年 9 月	土木学会	山田陽平、三浦佑己、曹順子、佐藤久、岡部聡
S O R S T シンポジウム「新規リン酸吸着剤の開発」	2008 年 9 月	科学技術振興機構	渡辺義公、佐藤久.
第45回環境工学研究フォーラム「微小電極を用いたANAMMOXグラニュール内の微生物活性の解析」	2008 年 11 月 28 日	土木学会	山田 陽平、佐藤久、岡部 聡、三浦 佑己、曹順子
第45回環境工学研究フォーラム「溶存バイオガスに着目した嫌気性廃水処理リアクターの開発」	2008 年 11 月 28 日	土木学会	佐藤久、池田真之、高橋慶多、深澤達矢、高橋正宏、岡部聡、中原禎仁、 笹川学.
第45回環境工学研究フォーラム「有機性廃棄物からのポリヒドロキシアルカン酸の生産」	2008 年 11 月 28 日	土木学会	羽深 昭、坂井田 健司、佐藤 久、深澤 達矢、高橋 正宏、伊藤 竜生、岡部 聡.
1st IWA Asia-Pacific Young Water Professionals Conference. 「Application of microsensors to in situ measurements of microbial activities in biofilms.」	2008 年 12 月 8 日	International Water Association	Satoh H., and Okabe S.
第43回日本水環境学会年会「溶存バイオガスに着目した新規嫌気性廃水処理リアクターの開発」	2009 年 3 月 17 日	日本水環境学会	佐藤 久、池田 真之、高橋 正宏、岡部 聡、中原 禎仁、笹川 学.
第43回日本水環境学会年会「有機性廃棄物からのポリヒドロキシアルカン酸の生産」	2009 年 3 月 16 日	日本水環境学会	羽深 昭、佐藤 久、高橋正宏、伊藤竜生、岡部聡.
第43回日本水環境学会年会「ANAMMOXリアクターの窒素除去速度に及ぼすメタン発酵脱離液含有溶存成分の影響」	2009 年 3 月 18 日	日本水環境学会	麦本佑一郎、笠原伸介、石川宗孝
平成20年度土木学会全国大会「ANAMMOXリアクターを用いたメタン発酵消化液からの窒素除去に関する基礎的研究」	2008 年 9 月 10 日	土木学会	麦本佑一郎、米田貴久、笠原伸介、古崎康哲、石川宗孝、北尾高嶺

平成20年度土木学会中国支部研究発表会「ANAMMOXプロセスにおける有機物質添加による活性評価」	2008年5月31日	土木学会	栗田貴宣, 百合昭太, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良
平成20年度土木学会全国大会「低分子有機酸存在下のANAMMOXの活性評価」	2008年9月10日	土木学会	栗田貴宣, 百合昭太, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良
第16回衛生工学シンポジウム「アナモックスプロセスにおける低分子有機酸の影響」	2008年11月14日	北海道大学	金田一智規, 栗田貴宣, 百合昭太, 尾崎則篤, 大橋晶良, 岡部聡
第24回大会日本微生物生態学会「低級脂肪酸存在下でのANAMMOX活性」	2008年11月26日	日本微生物生態学会	栗田貴宣, 百合昭太, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良
第45回環境工学研究フォーラム「低級脂肪酸がANAMMOX反応に及ぼす影響」	2008年11月29日	土木学会	栗田貴宣, 百合昭太, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良
第45回環境工学研究フォーラム「ANAMMOXリアクター内の細菌群集の機能・構造解析」	2008年11月29日	土木学会	百合昭太, 栗田貴宣, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良
第43回日本水環境学会年会「MAR-FISH法を用いた低級脂肪酸のANAMMOX反応に及ぼす影響」	2009年3月16日	日本水環境学会	栗田貴宣, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良
第43回日本水環境学会年会「ANAMMOXリアクター内の微生物群集の機能・構造解析」	2009年3月16日	日本水環境学会	百合昭太, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良
第43回日本水環境学会年会「塩分含有窒素排水のANAMMOX処理に関する微生物群の解析」	2009年3月16日	日本水環境学会	鈴木裕士, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良
International Conference on Civil and Environmental Engineering-2008 「The activity by Addition of Organic Matter in the ANAMMOX Process」	2008年10月9日	Hiroshima University	Takanori Awata, Shota Yuri, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki and Akiyoshi Ohashi.

The International Symposium Green Technology for Global Carbon Cycle in Asia 「The activity by addition of Short-chain fatty acids in the ANAMMOX Process」	2009年3月23日	Nagaoka University of Technology	Takanori Awata, Shota Yuri, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki and Akiyoshi Ohashi.
The International Symposium Green Technology for Global Carbon Cycle in Asia 「Community Structure and Function of Coexisting Bacteria in ANAMMOX Reactors」	2009年3月23日	Nagaoka University of Technology	Shota Yuri, Takanori Awata, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki and Akiyoshi Ohashi.

2009年度

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
原著論文 環境工学研究論文集, Vol.46, pp.681-688. 「低級脂肪酸が Anammox 細菌の異化・同化代謝に与える影響」	2009年11月	土木学会	栗田貴宣、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良
<i>Chemosphere</i> 78, 1129-1135. 「Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor」	2010年1月	Elsevier	Sunja Cho, Yoshitaka Takahashi, Naoki Fujii, Yohei Yamada, Hisashi Satoh, Satoshi Okabe
用水と廃水、51巻11号、嫌気性消化プロセスへの脱気膜の適用	2009年11月	(株)産業用水調査会	佐藤久、池田真之、高橋正宏、岡部聡、中原禎仁、笹川学
日本水環境学会年会「微小電極を用いた ANAMMOX グラニュール内の微生物活性の解析」	3月17日	日本水環境学会	佐藤久、高橋慶考、山田陽平、高橋正宏、岡部聡
日本水環境学会年会「Recovery of Dissolved Met	3月17日	日本水環境学会	W. M. K. R. T. W. Bandara, H. Satoh,

hane with a Degassing Membrane in an UASB Reactor]			M. Sasakawa, Y. Nakahara, M. Takahashi and S. Okabe
The 2 nd IWA Asia-Pacific Regional Young Water Professionals Conference 「Recovery of dissolved methane gas discharged from an UASB reactor with a degassing membrane」	5 Nov. 2009	International water association	W. M. K. R. T. W. Bandara, M. Ikeda, H. Satoh, M. Sasakawa, Y. Nakahara, M. Takahashi and S. Okabe
The 18 th Japan-Korea international symposium 「Recovery of dissolved methane gas discharged from an UASB reactor with a degassing membrane	26 Oct. 2009	日本水環境学会	W. M. K. R. T. W. Bandara, M. Ikeda, H. Satoh, M. Sasakawa, Y. Nakahara, M. Takahashi and S. Okabe
第 46 回環境工学研究フォーラム「脱気膜を用いた有機性廃水の水素発酵プロセスの高効率化」	11 月 28 日	環境工学委員会	池田 真之・佐藤久・高橋 正宏・岡部 聡・中原 禎仁・笹川 学
第 46 回環境工学研究フォーラム 「Recovery of dissolved methane with a degassing membrane in a UASB reactor」	11 月 28 日	環境工学委員会	W. M. K. R. T. W. Bandara, M. Ikeda, H. Satoh, M. Takahashi, S. Okabe, M. Sasakawa and Y. Nakahara
International Conference on Civil and Environmental Engineering ICCEE 2009 「The Activity of the Anammox in the presence of Organic Matter.」	2009 年 10 月 28-30 日	Pukyong National University	T.Awata, T. Kindaichi, N. Ozaki and A. Ohashi
International Conference on Civil and Environmental Engineering ICCEE 2009 「Enrichment of Marine Anammox Bacteria.」	2009 年 10 月 28-30 日	Pukyong National University	T. Kindaichi, T. Awata, K. Tanabe, N. Ozaki and A. Ohashi
平成 21 年度土木学会全国大会「海洋性アナモックス細菌の集積培養と微生物群集構造の解析」	2009 年 9 月 2-4 日	土木学会	金田一智規、栗田貴宣、鈴木裕士、尾崎則篤、大橋晶良
第 46 回環境工学研究フ	2009 年	土木学会	金田一智規、栗田貴

オーラム「海洋底泥から集積された海洋性アナモックス細菌群集の構造解析」			宣、田邊勝一郎、尾崎則篤、大橋晶良
第 44 回日本水環境学会年会「広島湾底泥から集積された海洋性 ANAMMOX 細菌の窒素除去性能と群集構造の解析」	2010 年 3 月 15-17 日	日本水環境学会	田邊勝一郎、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良
第 44 回日本水環境学会年会「低級脂肪酸存在下での Anammox 細菌の異化・同化代謝活性」	2010 年 3 月 15-17 日	日本水環境学会	栗田貴宣、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良
第 44 回日本水環境学会年会「脱気膜導入型アナモックスリアクターのバイオマス保持性能の評価」	2010 年 3 月 15-17 日	日本水環境学会	松永耕介、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良
第 46 回環境工学研究フォーラム講演集、pp.114-116、ANAMMOX プロセスのメタン発酵脱離液への適用に関する研究	2009 年 11 月	(社) 土木学会	麦本佑一郎・笠原伸介・石川宗孝
土木学会第 64 回年次学術講演会講演概要集 (CD-ROM)、ANAMMOX プロセスの窒素除去効果に及ぼすメタン発酵脱離液含有溶存成分の影響	2009 年 9 月	(社) 土木学会	麦本佑一郎・笠原伸介・石川宗孝

9. 研究成果による知的財産権の出願・取得状況

知的財産権の内容	知的財産権の種類、番号	出願年月日	取得年月日	権利者名
【発明の名称】生物処理装置及び生物処理方法	【出願番号】 特 願 2008-025668	2008 年 2 月 5 日		【発明者】佐藤久、中原禎仁、笹川学 【特許出願人】国立大学法人北海道大学、三菱レ

				イオン・エンジニアリング株式会社
【発明の名称】生物処理システム及び生物処理方法	【出願番号】 特願 2010-056767	2010年3月		【発明者】金田一智規、松永耕介、大橋晶良、尾崎則篤、幡本将史、中原禎仁、笹川学、北川靖子【特許出願人】国立大学法人広島大学、三菱レイヨン・エンジニアリング株式会社

10. 成果の実用化の見通し

ANAMMOX プロセスはオランダをはじめとして日本でも既に実用化されている技術である。本研究では、ANAMMOXプロセスの詳細を明らかにした。本研究の成果は、既に実用化されたANAMMOXリアクターのさらなる高効率化に寄与するものである。

11. その他

なし