

博士論文

養豚廃水処理施設における SNAD プロセスによる
窒素除去に関する研究

(Study on nitrogen removal by simultaneous partial nitrification,
anammox and denitrification (SNAD) process in a swine
wastewater treatment plant)

2022 年 3 月

立命館大学大学院理工学研究科
環境都市専攻博士課程後期課程

石本 史子

立命館大学審査博士論文

養豚廃水処理施設における SNAD プロセスによる窒素除去 に関する研究

(Study on nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox
and denitrification (SNAD) process in a swine wastewater treatment plant)

2022 年 3 月

March 2022

立命館大学大学院理工学研究科

環境都市専攻博士課程後期課程

Doctoral Program in Advanced Architectural, Environmental and Civil Engineering
Graduate School of Science and Engineering
Ritsumeikan University

石本 史子

ISHIMOTO Chikako

研究指導教員 惣田 訓 教授

Supervisor: Professor SODA Satoshi

目次

第1章 序論	1
第1節 畜産経営と環境対策	1
第2節 畜産廃水処理における窒素除去処理技術研究.....	2
第3節 アナモックスプロセスによる窒素除去の畜産廃水への適用の可能性.....	3
第4節 本論文の目的および構成	5
第1章参考文献	6
第2章 フルスケール養豚廃水処理施設におけるアナモックス菌集積と窒素除去の検討 ..	9
第1節 緒言	9
第2節 アナモックス菌集積の確認	9
2.1. 養豚廃水処理施設の概要	9
2.2. 試験方法	11
2.2.1. アナモックス活性測定.....	11
2.2.2. リアルタイム PCR 分析.....	12
2.2.3. 次世代シーケンス解析.....	13
2.3. 結果および考察	13
2.3.1. アナモックス活性.....	13
2.3.2. リアルタイム PCR 分析.....	14
2.3.3. 集積されたアナモックス菌の特徴.....	14
第3節 アナモックス菌集積要因および窒素除去プロセスの検討.....	16
3.1. 試験方法	16
3.2. 結果および考察	16
3.2.1. 曝気槽内環境および水質.....	16
3.2.2. SNAD プロセスによる窒素除去の可能性の検証.....	20
第4節 窒素除去能の変動要因の検討	21
4.1. 試験方法	21
4.2. 結果および考察	21
第5節 結言	24
第2章参考文献	25
第3章 小型試験装置を用いたアナモックス菌集積試験.....	28
第1節 緒言	28
第2節 曝気槽の環境を再現した小型試験装置によるアナモックス菌の集積.....	28
2.1. 試験方法	28
2.2. 結果及び考察	30

第3節 担体増設による窒素除去能力向上の検討.....	34
3.1. 試験方法.....	34
3.2. 結果および考察.....	35
第4節 結言.....	40
第3章参考文献.....	41
第4章 集積されたアナモックス菌の低温への適応の検証.....	42
第1節 緒言.....	42
第2節 低温期におけるグラニューールの浮上要因の検証.....	43
2.1. 試験方法.....	43
2.2. 結果および考察.....	43
第3節 浮遊グラニューールのアナモックス活性および水質の四半期別比較.....	44
3.1. 試験方法.....	44
3.1.1. 水質測定.....	44
3.1.2. グラニューールのアナモックス活性の比較.....	45
3.2. 実験結果および考察.....	46
3.2.1. 曝気槽内環境および水質の推移.....	46
3.2.2. アナモックス活性に及ぼす温度の影響.....	47
第4節 遺伝子学的手法による四半期別グラニューール菌叢の解析.....	50
4.1. 試験方法.....	50
4.2. 結果および考察.....	50
第5節 結言.....	54
第4章参考文献.....	56
第5章 曝気制御による窒素除去の安定化に関する実証試験.....	61
第1節 緒言.....	61
第2節 曝気制御による低温期の窒素除去能の安定化試験.....	61
2.1. 試験方法.....	61
2.2. 結果および考察.....	63
第3節 結言.....	66
第5章参考文献.....	67
第6章 結論および今後の展望.....	68
第1節 結論.....	68
第2節 今後の展望および課題.....	70
謝 辞.....	71
本論文に関連する発表.....	72

第1章 序論

第1節 畜産経営と環境対策

畜産業は、食肉や卵、牛乳・乳製品などの国産の畜産物を供給し、国民の生活を支える基幹産業のひとつである。国内の畜産業は食生活の高度化等を背景に大きな発展を遂げてきたが、農家当たりの飼養規模の拡大や地域における混住化の進行、環境問題への関心の高まり等を背景として、家畜排せつ物による悪臭や水質汚染といった「畜産環境問題」がみられるようになった¹⁾。畜産環境問題を未然に防ぐため、畜産経営においては環境保全に関する法令を遵守する義務がある。平成11年には「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」により、家畜排せつ物は流出や地下浸透がおこらない構造の施設で管理・処理することが義務づけられた。

家畜排せつ物の処理方法は、ふん尿分離処理とふん尿混合処理に大きく分類される。ふん尿分離処理はふんと尿を分離し、固形分は堆肥化処理、液体分は浄化処理や液肥化処理を行うものである。ふん尿混合処理は堆肥化処理が主流であるが、北海道の酪農経営など広い圃場を持つ経営体では、混合物を液肥として圃場に還元する方法も採用される²⁾。近年では混合物をメタン発酵処理し、発生したガスを発電等に利用する事例も増加傾向にある³⁾が、過剰施肥を原因とする地下水等の窒素による汚染も問題となっており⁴⁾、消化液の農業利用が見込めない場合は、放流を行うための浄化処理が必要となる。

循環型農業においては、家畜排せつ物は農地に還元され、その肥料成分で作物を栽培し、収穫物を家畜に給与するというサイクルが成立する。しかし、国内の大多数の養豚農家は排せつ物を還元するための農地を持たない。豚は1頭あたり1日に2.1kgのふんと3.8Lの尿を排せつする⁵⁾ことに加え、豚舎の洗浄等で発生する汚水を含め1頭あたり1日15Lの廃水が発生する⁶⁾。このため、小規模な経営を除き、養豚経営ではふん尿分離処理により、ふんは堆肥化処理した後に経営体外に販売し、尿を含む廃水は浄化処理を行って放流するのが一般的である⁷⁾。平成31年の報告では、養豚経営の約8割が分離処理を行っており、豚の排せつ物のうち、ふん尿混合処理では12%、ふん尿分離処理では尿の71%が浄化処理の後に放流されている²⁾。

一定規模以上の畜産経営体（豚房50m²以上、牛房200m²以上、馬房500m²以上）は水質汚濁防止法の特定事業場に位置づけられており、畜産業で発生する廃水については有害物質にかかる排水基準が適用される。平成29年における畜産農業の特定事業場は26447場存在する⁸⁾。有害物質のなかでも、「アンモニア、アンモニウム化合物、亜硝酸化合物、硝酸化合物の合計（硝酸性窒素等）」については、ふん尿を含む畜産廃水は窒素濃度が高く、ただちに一律排水基準値100mg/Lを達成するのが困難であったことから、基準が設定された平成13年から現在に至るまで暫定排水基準が設定されており、令和元年7月から令和4年6月までの3年間の基準値は500mg/Lである（Fig.1-1）。平成28年7月以降において、一律排水基準を達成している事業場の割合は448事業場のうち70.8%であったが、濃度が500mg/L未満の排水データでは6-8月は80%以上が基準を達成していたのに対し、それ以外の月ではその割合が65-79%と低下することが報告されており⁸⁾、年間を通して一律排水

基準を達成することの困難さが示されている。しかし、暫定排水基準は3年ごとに見直しが行なわれ、一律排水基準への移行を視野に入れた基準値の引き下げが行われていることから、いずれは一律基準まで引き下げられる可能性は高く、畜産廃水の窒素除去対策は喫緊の課題となっている⁹⁻¹¹⁾。

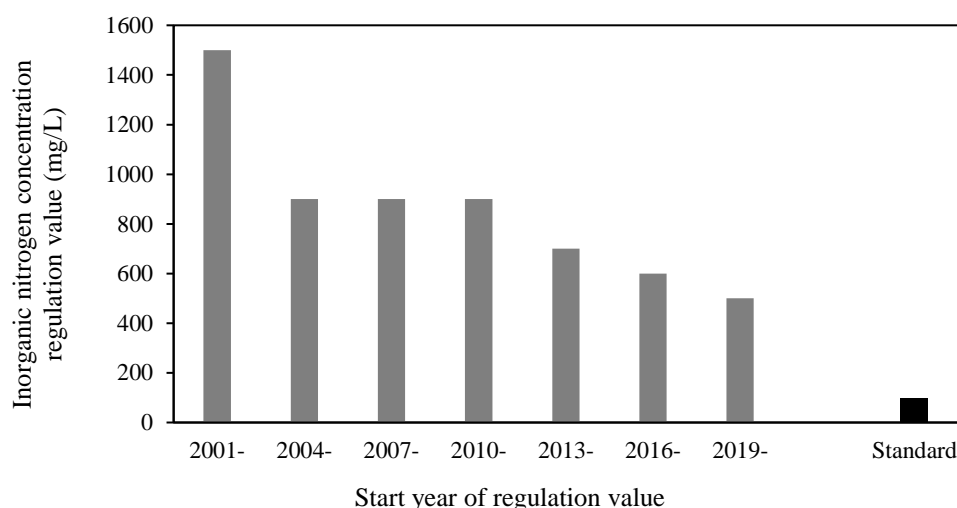


Fig.1-1. Trends in provisional standards for total of ammonium, nitrite and nitrate nitrogen in livestock wastewater.

第2節 畜産廃水処理における窒素除去処理技術研究

従来から畜産廃水処理施設は生物化学的酸素要求量 (BOD) および浮遊物質 (SS) の処理能力により設計されており⁶⁾¹²⁾、窒素除去を考慮に置いた設計はされていなかった。近年、一律排水基準への対応に向け、畜産廃水からの窒素除去に関する研究が様々な方法で行われている¹³⁾¹⁴⁾。養豚廃水に適用される窒素除去法としては循環式硝化脱窒法および間欠曝気法¹⁵⁾があげられるほか、硫黄脱窒法¹⁶⁾や、アナモックス反応を用いた窒素除去¹⁷⁾¹⁸⁾の適用も試みられている¹⁰⁾¹¹⁾。

循環式硝化脱窒法は、曝気を行う硝化槽の前に無酸素の脱窒槽を設置し、硝化槽流出液の一部を脱窒槽に循環させて流入汚水の BOD 源となる有機物を与えて脱窒を行うものである¹³⁾。間欠曝気法は曝気装置の稼働と停止を繰り返し、稼働中に硝化を、停止中に脱窒を進める方法で、連続式および回分式がある。間欠曝気法は既存施設の部分的な改造で適用できること、管理が容易であることから畜産分野に適した方法とされる¹³⁾が、間欠曝気または回分式運転で硝化脱窒により 90%以上の窒素除去を行うには BOD/N 比が 3 以上必要とされる¹⁵⁾¹⁹⁾。しかし、曝気槽に流入する畜産廃水の BOD/N 比は平均 2.7²⁰⁾と低く、十分な脱窒を行うには有機物の添加が不可欠となる。BOD 源としてはメタノールが一般的に利用されるが、メタノールの所要量理論値は硝酸性窒素 (NO₃-N) 1g あたり 2.47g とされ¹⁴⁾、窒素濃度の高い畜産廃水においては必要量が大きくコストが大きくなることが課題であり、メタノールに代わる安価な有機物資材の利用も検討されている¹³⁾¹⁴⁾。しかし、BOD 源の過剰な

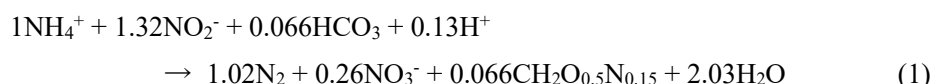
供給は処理水中の BOD を上昇させる可能性があり、適正な添加の時期と量を制御するためのシステムが必要となる。このため、これらの方法も実用化に向けた試験研究段階にとどまっているのが現状である。

硫黄脱窒法は硫黄を電子供与体として利用する硫黄酸化細菌の働きにより脱窒を行うものである¹⁴⁾¹⁶⁾。硫黄酸化脱窒菌は独立栄養細菌であるため有機物を必要とせず、処理槽に充填した硫黄資材が流入窒素量に応じて消耗するため資材の無駄がなく管理が容易とされ、実証規模試験が行われている¹⁴⁾が、水温低下時には能力が低下することや、硫黄資材の取り扱いなどに課題も残されている。

第3節 アナモックスプロセスによる窒素除去の畜産廃水への適用の可能性

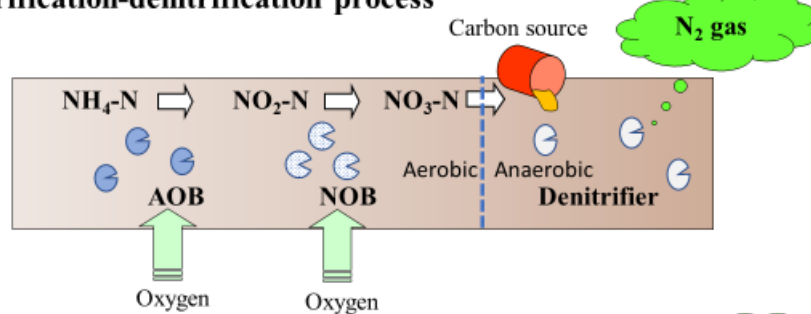
畜産の廃水処理にかかる経費（建設費の年償却費と年維持経費）の目安は肥育豚1頭あたり1500円以下が好ましく、2000円以上では負担が大きいとされる²¹⁾。したがって、窒素の高度処理システムを導入するにあたっては低コストで取り組めるプロセスが経営上望まれる。そこで、その条件を満たす窒素除去プロセスとしてアナモックス反応を利用した窒素除去プロセスが注目され、適用が試みられている。

アナモックス反応とは、1995年にオランダで発見された嫌氣的アンモニア酸化反応（**Anaerobic Ammonium Oxidation**）のことである²²⁻²⁴⁾。この反応では、嫌気条件下でアナモックス菌により亜硝酸性窒素（NO₂-N）とアンモニウム（NH₄-N）が窒素ガスと少量のNO₃-Nに変換され、その反応式は次のように提唱されている²⁵⁾。



従属栄養細菌である脱窒菌を利用した硝化脱窒法と独立栄養細菌であるアナモックス菌を用いたアナモックス法の比較をFig. 1-2に示す。硝化脱窒法ではアンモニア酸化細菌（AOB）により廃水中のNH₄-NをNO₂-Nに酸化し、亜硝酸酸化細菌（NOB）によりNO₂-NをNO₃-Nまで硝化した後に、嫌気条件下で硝酸呼吸を行う従属栄養脱窒菌による脱窒が行われる。畜産廃水のように窒素濃度が高くBOD/N比が低い廃水では、NH₄-NをすべてNO₃-Nまで硝化するには大量の曝気が必要であり、また前述したとおり脱窒のためのBOD源の添加が多く必要となるためにランニングコストが高くなる。一方、アナモックス法ではNH₄-Nのおよそ半量をNO₂-Nまで酸化するだけでよく、硝化脱窒法より曝気量が削減されることに加え有機物の添加を必要とせずに窒素除去が行われるため、硝化脱窒法に比較してランニングコストが低くなる²⁶⁾という利点がある。

Nitrification-denitrification process



Anammox process

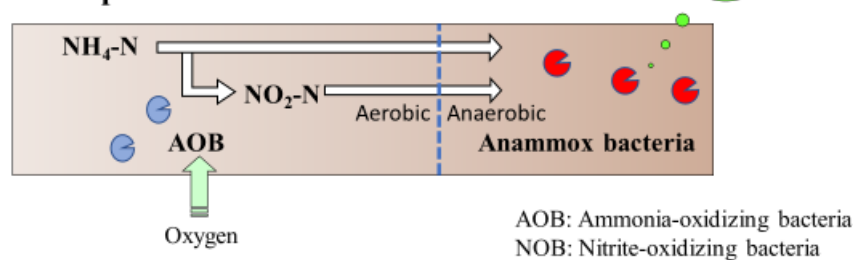


Fig.1-2. Comparison of nitrification-denitrification process and anammox process.

アナモックスプロセスを利用するには、まずアナモックス菌バイオマス量を十分に確保することが必要である。しかし、アナモックス菌は倍加時間が 11 日²⁵⁾と増殖が遅く、短期間に種汚泥を確保することが困難であることが課題²⁷⁾とされる。一方、国内の養豚および酪農廃水の活性汚泥処理 20 施設中 9 施設の曝気槽からアナモックス活性が検出され¹⁷⁾、さらに、複数の養豚廃水処理施設において活性汚泥中にアナモックス菌が存在すること²⁸⁾や、高いアナモックス活性を持つバイオフィルムの偶発的な集積が確認されている²⁸⁾²⁹⁾。フルスケールの廃水処理施設におけるアナモックス菌の自然集積の事例は冬季の水温が 30°C 前後と温暖な台湾の埋立地浸出液の処理プラント³⁰⁾、中国南部の養豚廃水処理施設³¹⁾があるが、非常に少ない。Wang ら³¹⁾がアナモックスシステムの普及と実用化は亜熱帯や熱帯地域に向いていると指摘したように、アナモックス菌の至適温度は 30–37°C^{23) 31)}と高い。しかし、加温を行っていない国内の複数の養豚廃水処理施設でアナモックス菌が集積されているということは、それらの施設の環境がアナモックス菌の生息に適した条件を備えているとともに、季節により水温が低下する条件下においてもアナモックスプロセスが成立する可能性を示している。

アナモックスプロセスには、NH₄-N の部分亜硝化とアナモックス反応を別々の槽で行う 2 槽型のプロセスと、1 つの槽で行う 1 槽型のプロセスがある。アナモックス菌が集積された養豚廃水処理施設においては、アナモックス菌バイオフィルムは曝気槽に存在する²⁸⁾ことから、1 槽型のプロセスが成立していると判断される。1 槽型アナモックスプロセスとしては、CANON (Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite) 法³²⁾、OLAND (Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification) 法³³⁾、SNAP (Single-stage nitrogen removal using

anammox and partial nitrification) 法³⁴⁾が開発されている。これらのプロセスでは、AOB とアナモックス菌が共存する環境下で $\text{NH}_4\text{-N}$ の部分亜硝化とアナモックス反応の組み合わせによる窒素除去が行われ、CANON 法や OLAND 法は窒素濃度が高く有機物を含まない廃水に適しているとされる³⁵⁾ ことから、有機物を含む畜産廃水が流入する槽でこれらのプロセスが成立しているとは考えにくい。一方、これらと同様に 1 槽型プロセスである SNAD (Simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification) プロセス³⁶⁾では、溶存酸素 (DO) 濃度の制限下でアナモックス菌と AOB に加えて従属栄養脱窒菌が共存し、アナモックス反応で発生する $\text{NO}_3\text{-N}$ を従属栄養脱窒菌が脱窒することで有機物が消費され、窒素と有機物が共に除去されるとされる³⁵⁻³⁸⁾。シーケンシングバッチリアクター (SBR) における試験では $\text{NH}_4\text{-N}$ と COD を含む人工廃水を SNAD プロセスで処理し、窒素除去率 > 88% と COD 除去率 > 90% が達成された事例³⁹⁾や、流加培養により養豚廃水の嫌気消化液から窒素除去率 80%、COD 除去率 76% を達成した事例³⁷⁾がある。また、アナモックス菌自然集積の事例^{30) 31)}においても、SNAD プロセスの可能性が示されている。したがって、アナモックス菌が集積された畜産廃水処理施設においてはこの SNAD プロセスによる窒素除去が行なわれている可能性が考えられる。

第 4 節 本論文の目的および構成

前述したように、国内の複数の養豚廃水処理施設でアナモックス菌の集積が確認されているが、変動する水温や水質がアナモックス菌の集積や窒素除去に与える影響についての詳細な調査は行われていなかった。静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターの養豚廃水処理施設では、2014 年 3 月にアナモックス菌の集積が確認されたことをきっかけに、この現象に着目して継続した調査を行ってきた。本論文は、この自生アナモックス菌の集積要因や窒素除去に及ぼす影響を明らかにし、養豚廃水処理におけるアナモックスプロセスの適用条件を明らかにすることを目的に、2014 年から 7 年間にわたり研究を行ってきた成果をまとめたものである。

本論文の構成を以下に示す。第 2 章では、同施設で発生するアナモックス菌バイオフィルムの特徴を明らかにするとともに、2 年間にわたる運転条件や水質の調査により、アナモックス菌の集積要因について検証を行う。また、アナモックス菌による窒素除去プロセスや窒素除去能の変動要因などについて検証を行う。第 3 章では、第 2 章で確認されたアナモックス菌の集積要因について、小型試験装置を用いた再現試験による検証を行う。また、アナモックス菌バイオマス量を増加させることによる窒素除去能の向上の可能性について検討を行う。第 4 章では、低温期に頻繁に浮上するアナモックス菌グラニュールが低温下でも高い活性を持つ可能性に着目し、水温の季節変動がアナモックス菌に与える影響を明らかにするとともに、集積されたアナモックス菌の低温への適応性について検証を行う。第 5 章では、曝気量制御システムの導入による窒素除去能の安定化および経済効果について検証を行う。第 6 章で本研究を総括する。

第1章参考文献

- 1) 農林水産省ホームページ: 畜産環境問題とは (2021.7.31 最終閲覧)
https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/t_mondai/01_mondai/index.html
- 2) 農林水産省生産局畜産部畜産振興課: 家畜排せつ物処理状況等調査結果 平成31年4月1日現在 (2021.7.31 取得)
https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/pdf/H31_syori-joukyou.pdf
- 3) 浅井真康: 家畜排せつ物のメタン発酵によるバイオガスエネルギー利用 令和2年度畜産環境シンポジウム資料 農林水産省 (2021.7.31 取得)
https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/pdf/2020_sympo_asai.pdf
- 4) 田瀬則雄: 硝酸性窒素による地下水汚染 地下水技術、48(1), 31-44 (2006)
- 5) 財団法人畜産環境整備機構: 畜産環境アドバイザー養成研修会【堆肥化处理・利用技術研修】(2005)
- 6) 財団法人畜産環境整備機構: 畜産環境アドバイザー養成研修会【畜舎污水处理技術研修】(2005)
- 7) 農林水産省: 畜産環境を巡る情勢 令和3年 (2021.7.31 取得)
<https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/pdf/210325kmegji.pdf>
- 8) 中央環境審議会水環境部会 排水規制等専門委員会: ほう素及びその化合物、ふっ素及びその化合物並びに アンモニア、アンモニウム化合物、亜硝酸化合物及び 硝酸化合物に係る暫定排水基準の見直しについて 令和元年(報告) (2021.7.31 取得)
https://www.env.go.jp/council/09water/y090-46a/mat01_1-1-1.pdf
- 9) 長峰孝文: 畜産廃水の硝酸性窒素等濃度削減にむけた取り組みと展望 畜産環境情報 45, 8-12 (2010)
- 10) 羽賀清典: 家畜糞尿処理の今後の方向性 日畜会報 81(2), 207-211 (2010)
- 11) 羽賀清典: 養豚排水を取り巻く情勢 養豚会 March 20-28 (2018)
- 12) 中村作次郎: 養豚場の廃水処理—浄化槽の設計・日常管理とトラブルシューティング 有限会社ベネット (2003)
- 13) 財団法人畜産環境整備機構: 畜舎污水浄化処理施設窒素対応管理マニュアル(2013)
- 14) 一般財団法人畜産環境整備機構: 畜産污水の処理技術マニュアル—処理の基本から高度処理まで— (2018)
- 15) Osada, T., Haga, K., & Harada, Y. Removal of nitrogen and phosphorus from swine wastewater by the activated sludge units with the intermittent aeration process. *Water Res.* 25(11), 1377–1388. (1991)
- 16) 長谷川輝明、田中康男: 粉末硫黄を利用した畜舎廃水の脱窒処理技術 畜産技術, 7, 3-8 (2015)
- 17) 和木美代子: 畜産廃水処理施設に存在するアナモックス菌とその利用の可能性 水環境学会誌、37 (A) (9), 325-328 (2014)
- 18) 和木美代子: 窒素を除去するアナモックス菌—畜産における可能性 畜産環境情報、56, 1-14 (2014)

- 19) 金主鉉、酒村哲郎、千葉信男、西村修、須藤隆一: 回分式間欠曝気活性汚泥法による豚舎排水の有機物・窒素除去に関するパイロットプラント実験 水環境学会誌、22 (12), 990-996 (1999)
- 20) 和木美代子、安田知子、福本泰之、黒田和孝、坂井隆宏、鈴木直人、鈴木良地、松葉賢次、鈴木一好: 養豚廃水の活性汚泥処理施設から排出される窒素の特性 水環境学会誌、33 (4), 33-39 (2010)
- 21) 財団法人畜産環境整備機構: 家畜ふん尿処理施設・機械選定ガイドブック(汚水処理編), (2004)
- 22) Mulder, A., Graaf, A. A., Robertson, L. A., Kuenen, J. G.: Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16(3), 177–184. (1995). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00281.x>
- 23) Strous, M., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M.: Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7), 3248–3250. (1999). <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.3248-3250.1999>
- 24) van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M., Kuenen, J. G.: Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142(8), 2187–2196 (1996). <https://doi.org/10.1099/13500872-142-8-2187>
- 25) Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M.: The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50(5), 589–596 (1998). <https://doi.org/10.1007/s002530051340>
- 26) Lackner, S., Gilbert, E. M., Vlaeminck, S. E., Joss, A., Horn, H., van Loosdrecht, M. C. M.: Full-scale partial nitrification/anammox experiences – An application survey. *Water Res.* 55, 292–303. (2014). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.032>
- 27) 徳富孝明: ANAMMOX 反応による窒素除去プロセス—研究開発の振り返りと今後の展望— 水環境学会誌, 37 (A) (9), 337-340 (2014)
- 28) Suto, R., Ishimoto, C., Chikyu, M., Aihara, Y., Matsumoto, T., Uenishi, H., Yasuda, T., Fukumoto, Y., Waki, M.: Anammox biofilm in activated sludge swine wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 167, 300–307 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.121>
- 29) Waki, M., Yasuda, T., Fukumoto, Y., Béline, F., Magrí, A.: Numerical assessment of nitrogen removal from swine wastewater in activated sludge systems: Comparison between continuous and intermittent aeration. *Bioresour. Technol. Rep.* 11, 100492 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100492>
- 30) Wang, C.-C., Lee, P.-H., Kumar, M., Huang, Y.-T., Sung, S., Lin, J.-G.: Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), 622–628 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.052>
- 31) Wang, X., Yang, R., Zhang, Z., Wu, J., Chen, S.: Mass balance and bacterial characteristics in an in-situ full-scale swine wastewater treatment system occurring anammox process. *Bioresource*

- Technology*, 292, 122005 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122005>
- 32) Third K A, Sliemers A O, Kuenen J G, Jetten M S.: The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 24(4), 588-596 (2001). <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00077>
 - 33) Kual, L. and W. Verstraete.: Ammonium removal by the oxygen -limited autotrophic nitrification-denitrification system, *App. Environ. Microbiol.* 64(11) 4500-4506 (1998)
 - 34) Lieu, P. K., Homan, H., Kurogi, A., Kawagoshi, Y., Fujii, T., Furukawa, K.: Characterization of sludge from single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitritation (SNAP). *Japanese J. Wat. Treat. Biol.* 42(2), 53–64 (2006).
 - 35) Lan, C.-J., Kumar, M., Wang, C.-C., & Lin, J.-G.: Development of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a sequential batch reactor. *Bioresour. Technol.* 102(9), 5514–5519 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.024>
 - 36) Chen, H., Liu, S., Yang, F., Xue, Y., Wang, T.: The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. *Bioresour. Technol.* 100(4), 1548–1554. (2009). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.003>
 - 37) Daverey, A., Hung, N.-T., Dutta, K., Lin, J.-G.: Ambient temperature SNAD process treating anaerobic digester liquor of swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 141, 191–198 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.045>
 - 38) Zhang, F., Peng, Y., Miao, L., Wang, Z., Wang, S., Li, B.: A novel simultaneous partial nitrification Anammox and denitrification (SNAD) with intermittent aeration for cost-effective nitrogen removal from mature landfill leachate. *Chem. Eng. J.* 313, 619–628 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.105>
 - 39) Daverey, A., Chen, Y.-C., Dutta, K., Huang, Y.-T., & Lin, J.-G.: Start-up of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in sequencing batch biofilm reactor using novel biomass carriers. *Bioresour. Technol.* 190, 480–486 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.064>

第2章 フルスケール養豚廃水処理施設におけるアナモックス菌集積と窒素除去の検討

第1節 緒言

第1章で述べたように、国内の複数の養豚廃水処理施設でアナモックス活性の存在¹⁾や、アナモックス菌の自然集積²⁾³⁾が報告されている。アナモックス菌がフルスケールの廃水処理施設で自然に集積された事例は少なく⁴⁾⁵⁾、それらの報告では集積されたアナモックス菌による SNAD プロセスの可能性が示されているが、アナモックス菌が集積される施設の槽内環境の条件や、水質や気候の変動が窒素除去に及ぼす影響について年間を通じた調査は行われていない。そこで、本章では、アナモックス菌が集積されている養豚廃水処理施設において、アナモックス菌の集積要因および集積されたアナモックス菌が窒素除去に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした調査を行った。本章第2節では、アナモックス活性の測定および遺伝子学的解析により、養豚廃水処理施設におけるアナモックス菌の集積の確認を行った。本章第3節では、施設の運転状況や水質について2年間にわたる調査を行い、アナモックス菌の集積要因および窒素除去に及ぼす槽内環境の影響について検討を行った。また、BOD/N比と窒素除去能の関係を調査し、SNADプロセスによる窒素除去の可能性について検討した。本章第4節では、窒素除去率の低下要因を明らかにする目的で、一過性に大幅な除去率の低下がみられた期間を抽出し、窒素除去率に変動を与える要因について解析を行った。

第2節 アナモックス菌集積の確認

2.1. 養豚廃水処理施設の概要

本研究で調査対象とした廃水処理施設は、静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターの養豚廃水を処理するために1989年に建設されたもので、連続式活性汚泥法により肥育豚換算で約900頭分にあたる1日あたり14m³前後の廃水を処理している。豚舎で発生する汚水は、大部分が豚舎内のピットでスクレーパーによりふんと分離され、一部は水で希釈したふん尿混合のスラリーとして、いずれも自然流下により施設まで送られる。施設の概略をFig. 2-2-1に示す。豚舎からの汚水は原水槽に流入し、0.15mm×0.45mmメッシュの固液分離スクリーンでSSを除去した後、約1日分の汚水を貯留する調整槽に投入される。調整槽からポンプアップされた汚水は分水ますの三角堰によって曝気槽への投入量が調整され、第1曝気槽（曝気槽）に投入される。曝気槽は容積47.5m³の1槽で、連続曝気が行われた後、第1沈殿槽（8.1m³）から接触酸化槽（14.6m³）および第2沈殿槽（7.5m³）を経て放流される。接触酸化槽の容積の2/3はハニカム状の担体が占めているが、析出物で閉塞して機能していない。曝気槽の水理的汚水滞留時間（HRT）は流入汚水量により変動し、平均77±12時間である。汚泥の引き抜きは不定期に行われ、1回の汚泥引抜量は1-2m³/日であり、汚泥滞留時間（SRT）は25日以上と長い。

この施設では、少なくとも2012年3月から、アナモックス菌の特徴である赤色バイオフィーム⁶⁾が曝気槽内に存在していることを観察している。赤色バイオフィームの発生状況をFig. 2-2-2に示す。このバイオフィームは汚泥引き抜き時に曝気槽の水位が下降すると、

その水面下 10 cm 以下の壁面や配管の表面に付着しているのが目視で確認される。バイオフィルムの表面には大小のグラニュール様の構造が観察される。さらに、沈殿槽においては、バイオフィルムから剥離したと考えられる赤色のグラニュールが水面に浮上する現象が観察される。

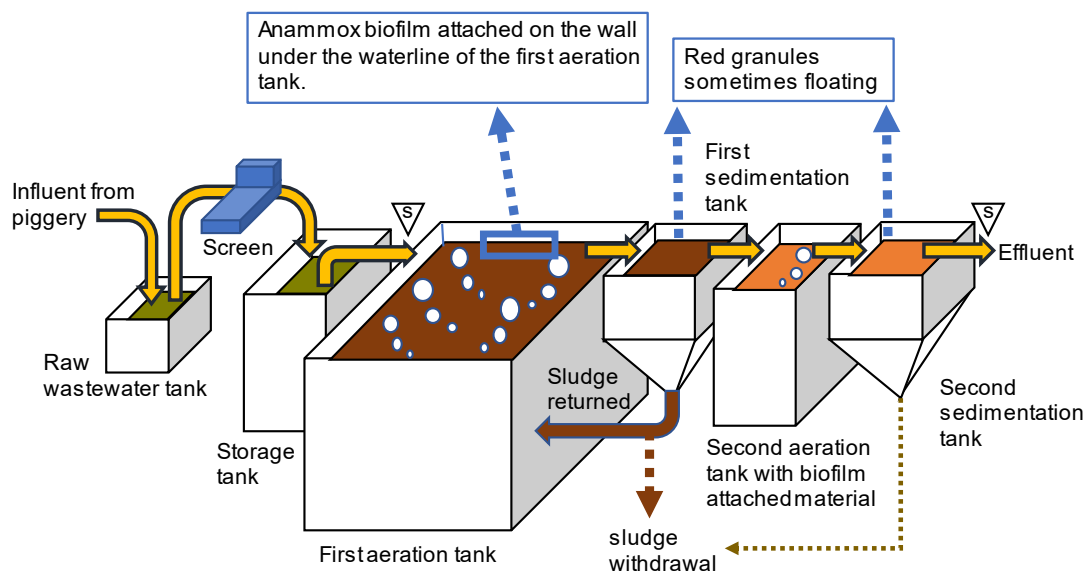


Fig. 2-2-1. Schematic of the swine wastewater treatment plant. The wastewater from the piggery flows into the raw wastewater tank, where coarse solids are quickly removed using a suction screen for solid-liquid separation. The influent is stored in a storage tank for almost one day and continuously send to the first aeration tank. The second aeration tank is set with biofilm-attached material; however, this material was clogged and not functioning. “S” in the down pointing triangle indicates the water sampling points.

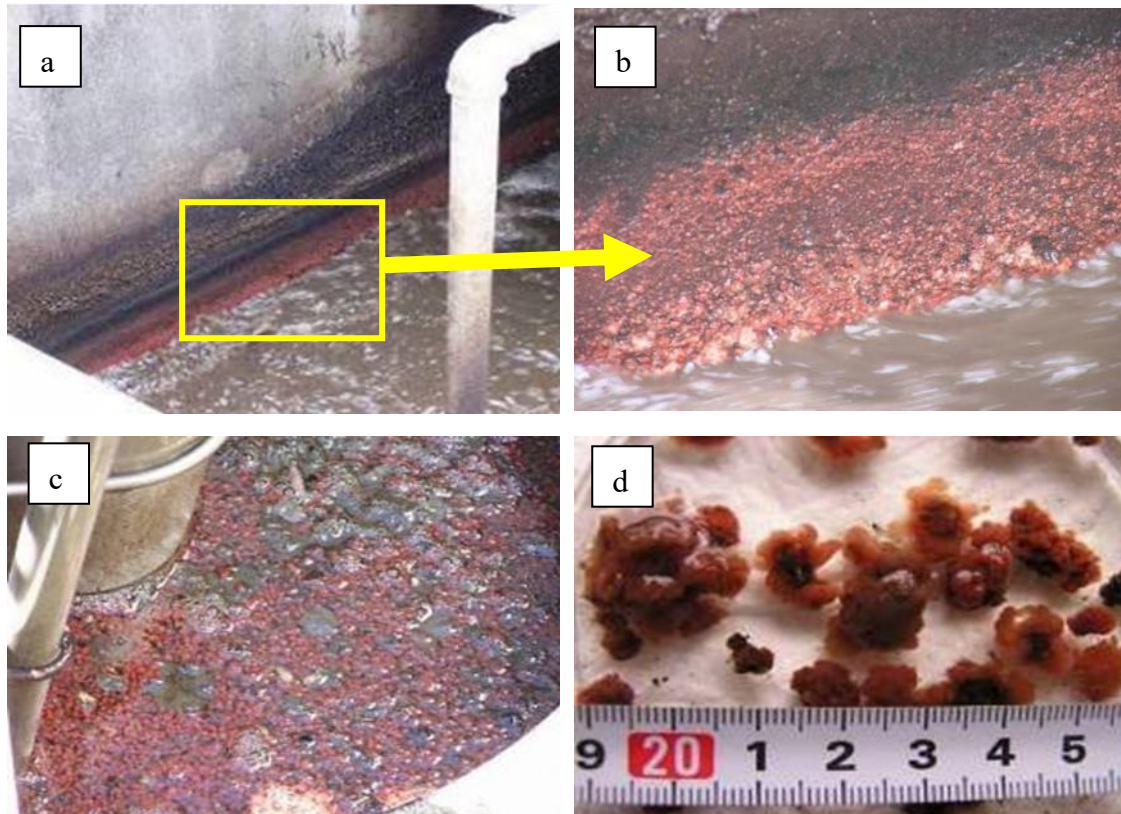


Fig. 2-2-2. Anammox biofilm in the swine wastewater treatment plant, (a)(b) red biofilm attached to the wall 10 cm under the waterline in the aeration tank, (c)(d) red granules floating in the sedimentation tank.

2.2. 試験方法

2.2.1. アナモックス活性測定

2014年3月に沈殿槽に浮上したグラニューールおよび2014年10月と2015年2月にそれぞれ曝気槽壁面から採取したバイオフィーム (BF1、BF2) について、トレーサーインキュベーション法¹⁾⁷⁾によりアナモックス活性を測定した。Table 2-2-1 に測定時に用いた合成培地の構成を示す。各サンプルは乳鉢で摩砕し、HEPES を含まない合成培地で3回洗浄した後、強熱減量 (IL) で 100 mg-IL/L の濃度となるよう合成培地に懸濁した。この懸濁液を嫌気グローブボックス内で pH を 7.6 に調整した後、25 mL ガラスバイアルに 10 mL ずつ分注し、ブチルゴム栓とアルミシールで密封した。バイアル上部のヘッドスペースをアルゴンガスで置換した後、ヘリウムガスで置換して無酸素条件とした。前培養として数時間静置した後、バイアルに ^{15}N で標識した亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) を 25 μmol および非標識 (^{14}N) の塩化アンモニウム (NH_4Cl) を 25 μmol 添加し、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しながら培養した。培養は 25°C で行った。経時的にヘッドスペースからガスを 50 μL 採取し、四重極型 GC-MS を用いたガスクロマトグラフ質量分析法 (GC 2010、GCMS QP 2010 Plus、島津製作所) により発生した窒素ガスの濃度を測定し、培養中の $^{29}\text{N}_2$ の生成量からアナモックス活性を推定した。なお、アナモックス反応による正味の N_2 生成量は、全体の $^{29}\text{N}_2$ 濃

度から (1) 周囲の空気中の $^{29}\text{N}_2$ からの汚染、(2) $^{15}\text{NO}_2$ を用いた脱窒による $^{29}\text{N}_2$ 生成、および (3) $^{15}\text{NO}_2$ の試薬中の $^{14}\text{NO}_2$ の汚染を差し引いて求めた。試験は 3 連で行った。

Table 2-2-1. Composition of synthetic medium for anammox activity measurement.

Components	Concentration
NaHCO ₃	420 mg /L
KH ₂ PO ₄	27.2 mg /L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	300 mg /L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	180 mg /L
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	475 mg /L
Trace element I	1 mL /L
Trace element II	1 mL /L
Components of trace element (per 1L)	
Trace element I	EDTA-2Na 5.71g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 9.15g
Trace element II	EDTA-2N 15g, ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0.43g, CoCl ₂ · 6H ₂ O 0.24g, MnCl ₂ · 4H ₂ O 0.99g, CuSO ₄ · 5H ₂ O 0.25g, Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 0.22g, NiCl ₂ · 6H ₂ O 0.19g, Na ₂ SeO ₄ 0.11g, H ₃ BO ₃ 0.014g

2.2.2. リアルタイム PCR 分析

2.2.1 でアナモックス活性を測定したバイオフィルム BF1 と BF2 に加え、2016 年 4 月に曝気槽の活性汚泥中から採取してメッシュサイズ 2、1、0.5 mm の篩を用いて >2 mm、1–2 mm、0.5–1 mm、<0.5 mm の 4 サイズに分画した赤色のフロックについて、アナモックス菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたリアルタイム PCR 法によりアナモックス菌 DNA 量を測定した。各サンプルは、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Bio, Japan) を用いて全 DNA を抽出した後、QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) を用いて精製した。抽出から精製までは各サンプル 2 連で行った。精製したサンプルの DNA 濃度を Eppendorf Bio Spectrometric basic (Eppendorf, Germany) を用いて測定し、1 サンプル 2 連の DNA を合わせて 5 ng/μL となるよう TE で調整したものをサンプル DNA とした。リアルタイム PCR の反応液は、Sso Advanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) 10 μL、Table 2-2-2 に示す 50 pmol/μL プライマー各 0.12 μL、スタンダードまたはサンプル DNA 1 μL および滅菌蒸留水 8.76 μL の割合で混合したものを用い、スタンダードは 2 連、サンプルは 4 連で 96 ウェルプレートに分注した。リアルタイム PCR 検出システムは MyiQ2 (Bio-Rad) を用い、98 °C で 2 分加熱の後、変性 98 °C 15 秒、アニーリングおよび伸展 58 °C 60 秒を 40 サイクルで DNA の増幅を行った。各サンプルは別途 105 °C で 2 時間乾燥させて重量を測定した後、600 °C で 2 時間灰化処理を行って IL を算出し、アナモックス菌 DNA 量はサンプル IL あたりの DNA 量として計算した。

Table 2-2-2. PCR primer pairs based on 16S-rRNA genes.

Primers	Sequence (5'-3')	Reference
AMX 368f	TTCGCAATGCCCGAAAGG9	Schmid et al. ⁸⁾
AMX 820r	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	

2.2.3. 次世代シーケンス解析

2.2.1 においてアナモックス活性を測定したグラニューールおよび 2.2.2 において菌量を測定した 4 サイズのフロックについて、細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした次世代シーケンス解析を行った。サンプルからの DNA 抽出および精製は、2.2.2 で示す方法により行った。PCR 反応液は 5U/ μ L Ex Taq Hot Start Version (Takara, Japan) を 1 μ L、10 \times Ex Buffer を 1 μ L、各 2.5mM の deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) を 0.8 μ L、Table 2-2-3 に示す 10mM Forward primer 563F および 10mM Reverse primer R1–R4 等量混合液を各 0.5 μ L、Sample DNA (0.5ng/ μ L) を 2 μ L 含む 10 μ L で調整し、PCR 増幅は反応液を 95 °C で 5 分間保持した後、95 °C で 30 秒間の変性、55.8 °C で 30 秒間のアニーリング、72 °C で 1 分間の伸長を 30 サイクル行い、72 °C で 10 分間の最終伸長を行った。

Table 2-2-3. PCR primer sets used for pyrosequencing analysis.

Primers	Sequence (5'-3')	Reference
563F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAYTGGGY-DTAAAGNG	Zhang et al. ⁹⁾
R1	GTGACTGGAGTTCAGACGCTGTGCTCTTCCGATCTTACCR-GGGTHTCTAATCC	
R2	GTGACTGGAGTTCAGACGCTGTGCTCTTCCGATCTTACCA-GAGTATCTAATTC	
R3	GTGACTGGAGTTCAGACGCTGTGCTCTTCCGATCTCTACD-SRGGTMTCTAATC	
R4	GTGACTGGAGTTCAGACGCTGTGCTCTTCCGATCTTACNV-GGGTATCTAATC	

PCR 産物は AMPure XP (Beckman Coulter、USA) を用いて精製した後、標準的なプロトコルに従って Illumina MiSeq プラットフォーム (Illumina、USA) でペアエンドシーケンシングを行った。得られたリードは Sickle (<https://github.com/najoshi/sickle>) を用いて、品質値 (QV) が 20 未満の塩基をトリミングした。トリミングした結果、41 塩基未満となったリードは対になるペアエンドリードとともに除外した。得られたペアエンドリードは DDBJ の Sequence Read Archive に登録した。アクセッション番号は以下の通りである。BioProject : PRJDB8118、BioSample : SAMD00165693–SAMD00165696、及び SAMD00165699。ペアエンドリードは、FLASH¹⁰⁾を用いてデフォルトのパラメータでマージして一つの配列とした。Greengenes データベースの 97%データセットを用いて UCHIME アルゴリズム¹¹⁾によりキメラアンプリコンを検出した。キメラアンプリコンを除外した配列について、QIIME1¹²⁾のワークフロースクリプト(pick_de_nobo_otus.py)を用いて、デフォルトのパラメータで参照配列なしで、分類単位 (operational taxonomic unit) の構築とその分類学的推定を行った。

2.3. 結果および考察

2.3.1. アナモックス活性

浮遊グラニューールにおいては、 $339 \pm 73 \mu\text{mol-N}_2/\text{g-IL/h}$ という高いアナモックス活性が認められた。これは、養豚廃水処理施設で確認された既報のアナモックス活性 $25.8 \mu\text{mol-N}_2/\text{g-}$

vss/h¹)より高い値であった。またバイオフィーム BF1 および BF2 においてもグラニューールよりは低値であったが、45.6 $\mu\text{mol-N}_2/\text{g-IL/h}$ および 43.7 $\mu\text{mol-N}_2/\text{g-IL/h}$ の活性が認められ、曝気槽のバイオフィームやグラニューールにアナモックス菌が集積されていることが確認された。

2.3.2. リアルタイム PCR 分析

バイオフィーム BF1 および BF2 ではそれぞれ 1.2×10^8 、 3.0×10^9 copies/g-IL のアナモックス菌の存在が確認された。4 サイズに分画した浮遊フロックにおけるアナモックス菌 DNA 数を Fig. 2-2-3 に示す。>2 mm で 7.9×10^{11} copies/g-IL、1-2 mm で 1.7×10^{11} copies/g-IL、0.5-1 mm で 1.4×10^{10} copies/g-IL、<0.5 mm で 2.0×10^8 copies/g-IL と、大きいフロックほど高濃度にあなモックス菌が集積されていることが確認された。アナモックス菌の集積試験では無機合成培地を用いた SBR で $2.48 \pm 0.22 \times 10^{12}$ copies/g-VSS および上向流嫌気汚泥ブランケット (UASB) リアクターで $6.23 \pm 0.59 \times 10^{12}$ copies/g-VSS という報告¹³⁾がある。今回の試験における最大アナモックス菌 DNA コピー数はこれらの 1/10 程度であったが、有機物を含む養豚廃水においても高濃度にあなモックス菌が集積されることが明らかとなった。

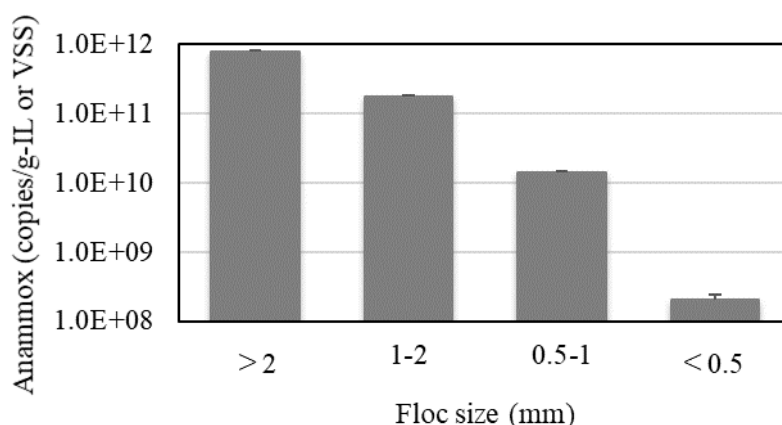


Fig. 2-2-3. Anammox 16S rRNA gene copy numbers in sieved flocks.

2.3.3. 集積されたアナモックス菌の特徴

次世代シーケンスの解析結果を Fig. 2-2-4 に示す。門レベルでの解析では、浮遊グラニューールでは総リード数の 62.5%をアナモックス菌が属する Planctomycetes が占めていた (Fig. 2-2-4 a)。また浮遊フロックにおいては、Planctomycetes の占有率は 0.3-37.2%で、大きいフロックほど占有率が高かった。小さいフロックでは Planctomycetes に替わり、AOB や脱窒菌が属する Proteobacteria の割合が増加した。属レベルにおける Planctomycetes の内訳を Fig 2-2-4b に示す。アナモックス菌では、*Candidatus Jettenia* および *Candidatus Brocadia* の存在が確認された (Fig. 2-4 b)。浮遊グラニューールでは Planctomycetes の 99.0%を *Candidatus Jettenia* が占めていた。また、>2 mm および 1-2 mm の大きいフロックにおいても、*Candidatus*

Jettenia がアナモックス菌の最優占種であったが、フロックのサイズが小さくなるにつれ、Candidatus Brocadia の割合が増加し、それぞれ 10.9% および 33.3% を占めていた。Candidatus Jettenia や Candidatus Brocadia は、廃水処理システムにおける代表的なアナモックス細菌である¹⁴⁾とともに、酢酸などの揮発性脂肪酸を利用できるとされる¹⁵⁾ことから、有機物の存在する畜産廃水でこれらのアナモックス菌が集積されたことは、この特性が関連しているものと考えられた。また、2014年3月採取のグラニューールおよび2016年4月採取のフロックのいずれにおいても Candidatus Jettenia が検出されたことから、この施設においては Candidatus Jettenia が継続的に存在しているものと判断された。一方、1mm未満の小さいフロックでは、Planctomycetes の大部分がアナモックス菌以外の細菌であった。これは大きいフロックほど酸素透過性が低く、偏性嫌気性菌であるアナモックス菌に好ましい環境である¹⁶⁾ことによるものと考えられた。

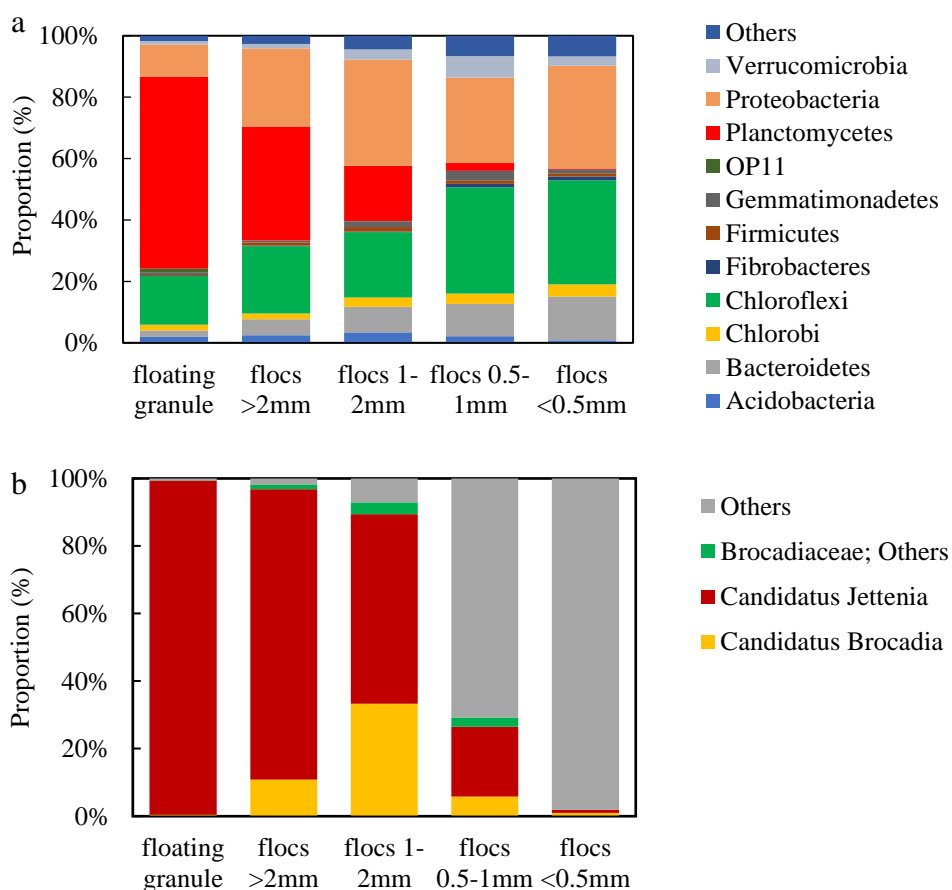


Fig. 2-2-4. Relative abundance of (a) predominant bacterial phyla and (b) Planctomycetes genera. ‘Others’ comprises phyla with <1% abundance of genera other than anammox bacteria. ‘Brocadiaceae; Others’ comprises other genera in Brocadiaceae.

第3節 アナモックス菌集積要因および窒素除去プロセスの検討

3.1. 試験方法

2016年4月から2018年3月までの2年間の試験期間とし、週1回、流入水、曝気槽内および処理水について水温およびpHを測定した。水質は、流入水および処理水について全窒素(TN)濃度、無機態窒素(IN)濃度、BOD、化学的酸素要求量(COD)、SSを測定した。また、曝気槽においてはIN、DO濃度、活性汚泥浮遊物質(MLSS)、揮発性活性汚泥浮遊物質(MLVSS)の測定を行った。さらに、各槽における窒素処理状況の確認のため、第1沈殿槽および接触酸化槽のIN濃度の測定も併せて行った。

各項目は「下水試験方法」¹⁷⁾に準じて測定した。水温およびpHは、pH/EC/TDS/°CテスターHI98310(Hanna Instruments、USA)を用いて測定した。DO濃度はポータブル測定器HQ40dおよび蛍光式溶存酸素プローブLDO10105(Hach Co.、USA)を用い、センサーを曝気槽内に投入して測定した。BODは蛍光式溶存酸素計Hach 40d(Hach Co.)を用いた電極法により行った。なお、有機物の処理状況の指標とするため、処理水については1mg/LのN-アシルチオ尿素溶液を添加し、硝化抑制BOD(C-BOD)として測定した。CODは二クロム酸カリウムによるリアクター分解法、TNは過硫酸塩分解法により、携帯用多項目迅速水質分析計DR2400(Hach Co.)を用いて測定した。INについては、NH₄-NはイオンクロマトグラフIC1100(Dionex、USA)でCS16カラムを用い、NO₂-NとNO₃-NはイオンクロマトグラフIC20(Dionex)でAS11-HCカラムを用いて分析した。活性汚泥は5mLを1500gで遠心分離して蒸留水で2回洗浄し、105°Cで2時間乾燥させてMLSSを測定した後、600°Cで2時間の灰化処理によりMLVSSを測定した。BODおよびSSについては月1回、それ以外の項目については週1回の測定を行った。なお、BOD測定サンプル数が少ないため、BODとその他のデータの測定日が同じでない場合は、5日以内のずれを同じ日とみなして分析した。

3.2. 結果および考察

3.2.1. 曝気槽内環境および水質

曝気槽の水温、DO濃度、pHの推移をFig.2-3-1に示す。水温は、気温の変化に応じて変動し、調査期間中の最高温度は34.2°C、最低温度は10.1°C、平均温度は22.8±6.7°C(平均±偏差S.D.)であった。アナモックス菌の至適温度は30–37°C¹⁸⁻²⁰⁾とされるが、施設の水温は夏季の一時を除きそれ以下であった。曝気槽のDO濃度は最大2.0mg/Lの一過性の急激な上昇も観察されたが、平均値は0.31±0.39mg/Lと低値で推移した。アナモックス菌は偏性嫌気性菌である²⁰⁾が、1槽型リアクターにおいてはNH₄-N酸化のための酸素を必要とするため至適DO濃度は0.5mg/L前後²¹⁾とされており、この条件は曝気槽内環境とおおむね一致した。曝気槽内のpHは6.0–8.1の範囲で変動がみられたが、平均pHは7.4±0.5とおおむね中性域にあり、アナモックス菌の至適pHとされる6.7–8.3²⁰⁾の範囲内であった。

DO濃度の上昇にともないpHが低下する傾向がみられたが、これは豚の飼育頭数の変化、大雨による希釈、暑熱対策としての豚舎の散水量の増加等の要因で流入水の濃度が低下したことが誘因と考えられた。

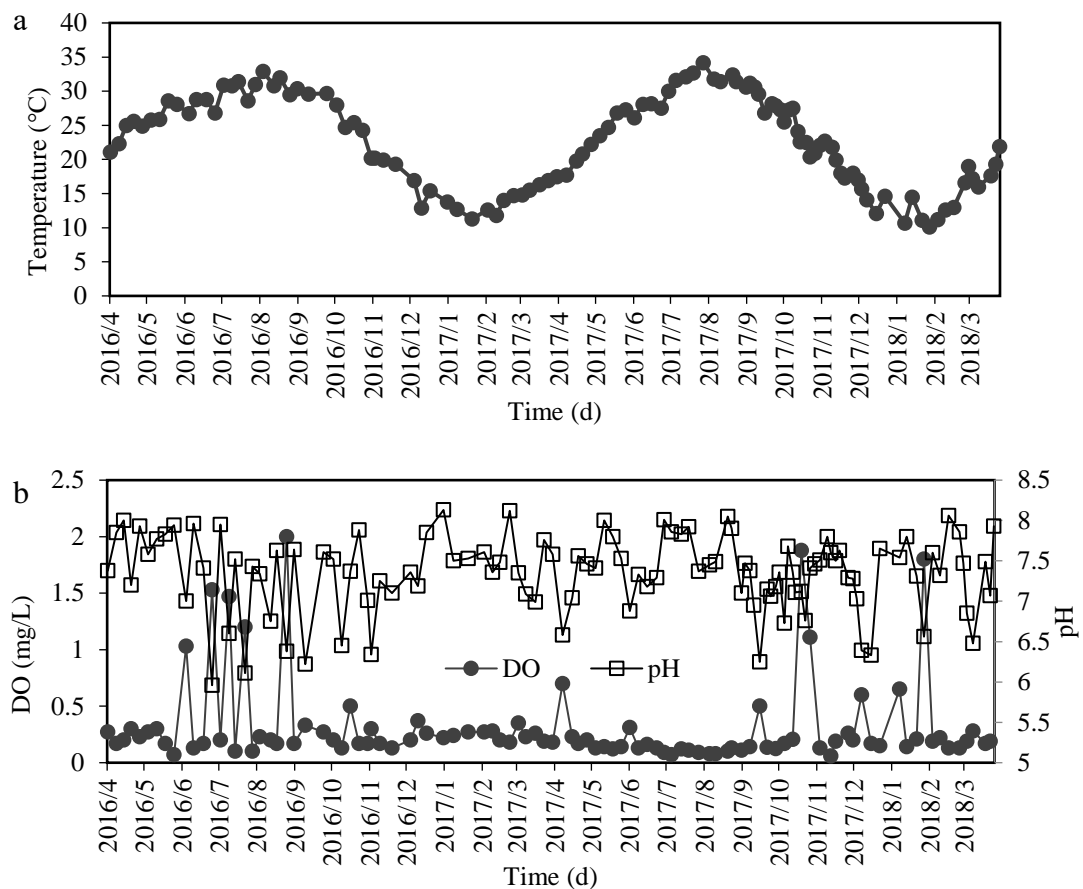


Fig.2-3-1. Conditions recorded in the first aeration tank. (a) changes in water temperature (b) DO concentration and pH.

流入水と処理水の水質を Table 2-3-1 に示す。流入水の BOD 濃度は飼育豚の数の変動や気象条件の変化により、555–2500 mg/L の範囲で変化し、平均 BOD 濃度は 1104 ± 513 mg/L であった。流入水量は 14 ± 3 m³/d、曝気槽の BOD 容積負荷は 0.32 ± 0.12 kg/m³/d で、養豚廃水処理施設における値としてはやや低いものの平均的な負荷の範囲内であった。流入水の BOD 濃度の変動にかかわらず、処理水の BOD 濃度は 44 ± 27 mg/L で BOD 除去率は $95 \pm 4\%$ と高く安定しており、この施設における廃水処理は良好に行われていたと判断された。DO 濃度は低いですが、養豚廃水の活性汚泥処理では従属栄養細菌は成長速度が速く、酸素との親和性が高いために BOD 除去率は高くなる²²⁾ と考えられた。流入水の COD 濃度は 3984 ± 1484 mg/L と高かったが、流入水の BOD/COD 比は 0.25 ± 0.05 と低く、廃水中の生分解性の低い物質の割合が高いと考えられた²³⁾ ことから、有機物の評価には BOD を用いるのが妥当と判断した。MLSS は 10770 ± 1925 mg/L、MLVSS は 8249 ± 1450 mg/L と、高濃度で維持されていた。

Table 2-3-1. Wastewater characteristics of influent and effluent.

	Unit	Influent		Effluent	
		Means ± S.D.	Measurements	Means ± S.D.	Measurements
pH	-	8.36 ± 0.34	111	7.35 ± 0.49	111
BOD	mg/L	1104 ± 513	30	44 ± 27*	23
COD	mg/L	3984 ± 1484	19	409 ± 146*	19
TN	mg/L	629 ± 198	25**	154 ± 92*	25**
NH ₄ -N	mg/L	457 ± 128	111	91 ± 66	111
NO ₂ -N	mg/L	0.01 ± 0.08	111	42 ± 56	111
NO ₃ -N	mg/L	0 ± 0.04	111	13 ± 29	111
TIN	mg/L	457 ± 128	111	146 ± 92	111
BOD/TN	mg/L	1.78 ± 0.58	25	0.37 ± 0.24	18
SS	mg/L	1743 ± 712	23	35 ± 14*	5***

BOD: biological oxygen demand; COD: chemical oxygen demand; TN: total nitrogen; TIN: total inorganic nitrogen; SS: suspended solids *Data sampled from second sedimentation tank

** Data after sampling period in October 2016

***Data after sampling period in March 2018

流入水の TN 濃度および全無機態窒素 (TIN) 濃度は、それぞれ 629 ± 198 および 457 ± 128 mg/L であったが、曝気槽の TIN 濃度は 146 ± 92 mg/L、処理水の TN 濃度は 154 ± 92 mg/L と減少し、TN 除去率は $75 \pm 14\%$ 、TIN 除去率は $68 \pm 17\%$ であった。なお、施設の各槽における TIN 除去率は第 1 沈殿槽で $70 \pm 16\%$ 、接触酸化槽で $70 \pm 17\%$ 、第 2 沈殿槽で $72 \pm 16\%$ と、曝気槽とそれ以降の槽では有意な差が認められず、この施設における窒素除去は曝気槽で大部分が行われていることが確認された。

IN 濃度の推移を Fig. 2-3-2a に示す。流入水の IN 濃度の変動は大きく、夏～秋季は大雨や暑熱対策の散水の影響により濃度が低下した一方で、冬季の IN 濃度は上昇する傾向がみられた。処理水においては、NH₄-N は年間を通してほぼ常時検出され、NO₂-N が同時に存在することが多かったことから、曝気槽内にはアナモックス反応の基質である NH₄-N と NO₂-N がほぼ常時存在することが確認された。特に冬季は流入水の TIN 濃度の上昇とともに処理水の NH₄-N および NO₂-N 濃度の上昇が認められた。一方で、NO₃-N は 2016 年秋季の一時期の上昇を除いてはほぼ検出されなかった。IN 除去率の推移を Fig. 2-3-2b に示す。IN 除去率は週ごとの変動が大きく、また、流入水の窒素濃度が高い冬季に除去率はやや低下する傾向がみられた。曝気槽における IN 負荷量と除去速度の推移を Fig. 2-3-2c に示す。IN 負荷量は 0.13 ± 0.03 kg-N/m³/d、除去速度は 0.09 ± 0.03 kg-N/m³/d で、除去率と同様に週ごとの変動が大きく、冬季は負荷量と除去速度の差が他の季節より大きい傾向がみられたが、2018 年 2-3 月には高い除去速度が記録されている。また、NO₃-N の蓄積がみられた 2016 年 10-11 月には IN 除去率および IN 除去速度の低下がみられた。NO₃-N まで硝化を進めることはアナモックス反応にとっては基質が不足すること、従属栄養脱窒にとっては BOD/N 比が低いことにより、窒素除去に不利な状態になるものと考えられた。

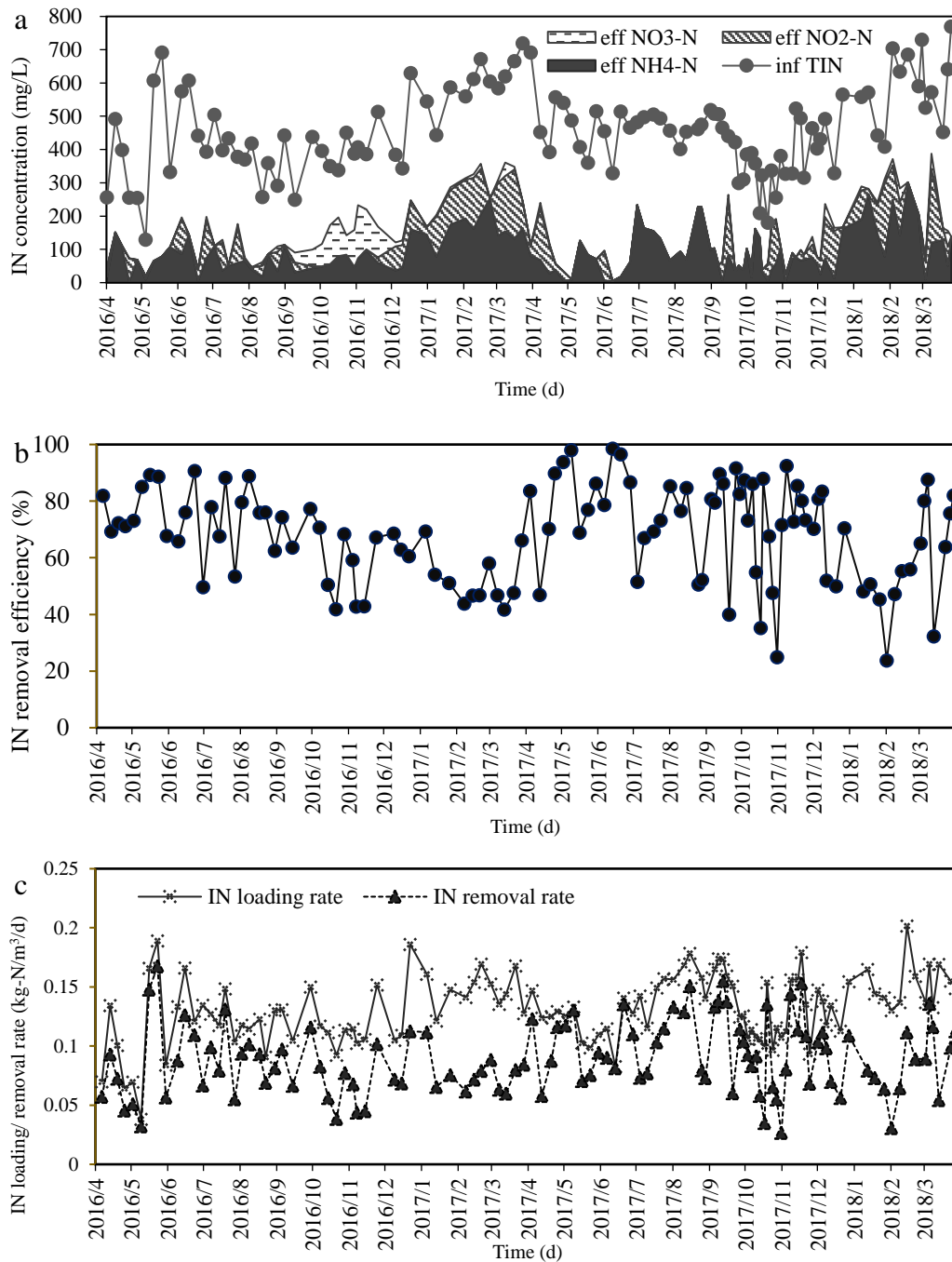


Fig. 2-3-2. Nitrogen measurements (a) total inorganic nitrogen (TIN) concentration in the influent (inf) and inorganic nitrogen (IN) concentrations in the effluent (eff) (b) IN removal efficiency, IN loading rate and removal rate.

以上のことから、この施設の曝気槽においては、良好に廃水処理が行われていること、DO濃度およびpHがアナモックス菌の至適範囲内にあること、アナモックス反応の基質であるNH₄-NとNO₂-Nが存在すること、倍加速度が約11日²⁴⁾と遅いアナモックス菌が25日以上

と長い SRT により保持されること、曝気槽壁面がバイオフィルムの固定床として機能したことでアナモックス菌が集積されたものと判断された。水温は至適温度より低かったが、第2節 2.3.1 において、水温の低い3月に採取したグラニューールで高いアナモックス活性を確認していることから、低温期においてもアナモックス反応による窒素除去が行われている可能性が考えられた。

3.2.2. SNAD プロセスによる窒素除去の可能性の検証

各温度条件 ($\leq 20^\circ\text{C}$ 、 $20\text{--}30^\circ\text{C}$ 、 $\geq 30^\circ\text{C}$) における曝気槽内の DO 濃度と IN 除去率の関係を Fig. 2-3-3a に示す。

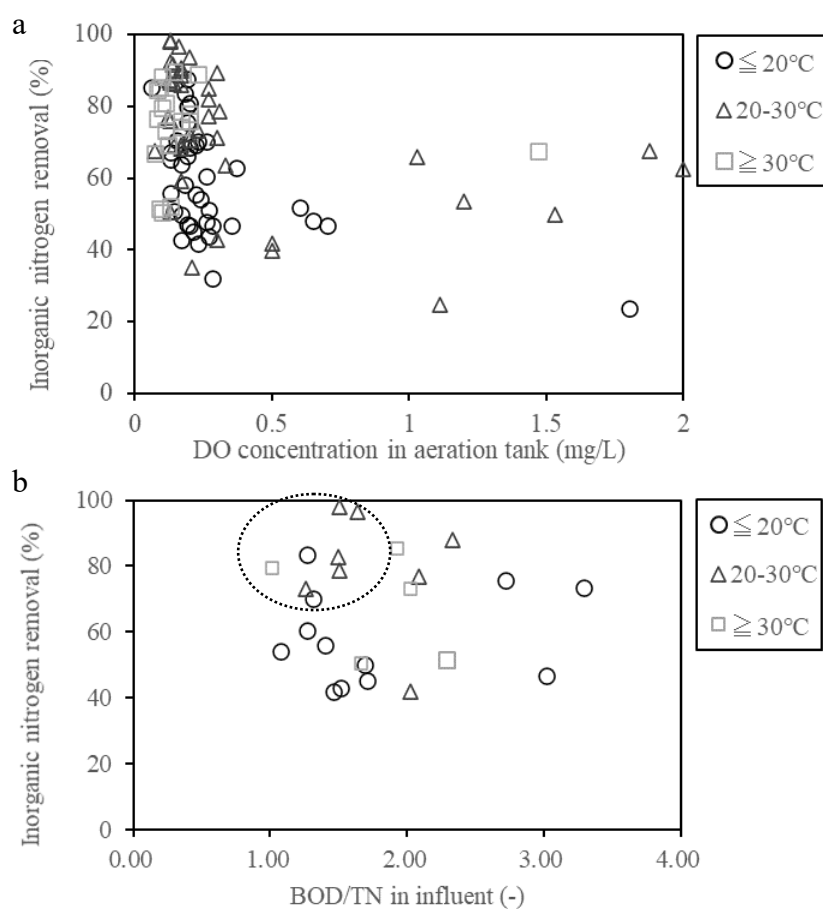


Fig.2-3-3. Comparison with inorganic nitrogen removal efficiency in three temperature range: (a) Dissolved oxygen concentration (b) BOD/TN ratio of influent. The dotted circle indicates the range of BOD/TN ratio is <1.8 and the nitrogen removal rate is $>70\%$.

DO 濃度が 0.3 mg/L 以下の場合の平均 IN 除去率は $61 \pm 14\%$ ($\leq 20^\circ\text{C}$)、 $78 \pm 16\%$ ($20\text{--}30^\circ\text{C}$)、 $75 \pm 12\%$ ($\geq 30^\circ\text{C}$) と高値で推移した一方、 0.3 mg/L 以上の場合には $47 \pm 13\%$ (\leq

20 °C)、55 ± 16% (20–30 °C)、68% (≥ 30°C) と除去率が低下したことから、いずれの温度条件においても DO 濃度が 0.3 mg/L 以下で高い窒素除去量が得られることを確認した。各温度条件における流入水の BOD/TN 比と TN 除去量との関係を Fig. 2-3-3 b に示す。BOD/TN 比と IN 除去率には相関は認められず、BOD/TN 比が 1.5–1.6 と低い条件下においても、95%の高い除去率が認められた。窒素除去においては、BOD/TN 比が重要な要素のひとつであり、畜産廃水では SBR での試験において、従属栄養脱窒で十分な窒素除去を行うためには、BOD/TN 比が 3 以上必要と考えられている^{25) 26)}。また、NO₂-N を経由するショートカット硝化脱窒は理論的には 40%の有機炭素源を削減できるとされる²⁷⁾が、十分な窒素除去を行うには BOD/TN が 1.8 以上必要と推定される。曝気槽では DO 濃度が低く、NO₂-N の蓄積がみられたことから、低 DO 濃度下で NO₂-N を介したショートカット硝化脱窒が発生している²²⁾と考えられるが、流入水の BOD/TN 比が 1.8 以下であっても 70%以上の高い窒素除去率が得られている。これは、ショートカット硝化脱窒だけでなく、アナモックス反応による窒素除去も同時に行われているということを示しており、アナモックス反応と脱窒反応が同時におこる SNAD プロセスにより窒素除去が行われているものと判断された。

曝気槽内の DO 濃度が低いほど高い窒素除去率が観察されたことから、養豚廃水処理において SNAD プロセスの最適な運転条件を得るためには、DO 濃度を 0.3 mg/L 以下に維持する必要があると判断された。これは SNAD プロセスにおける至適 DO 濃度は 0.5 mg/L 以下とする報告^{28) 29)}に一致する結果であり、DO 濃度のコントロールの重要性が確認された。

第 4 節 窒素除去能の変動要因の検討

4.1. 試験方法

月平均の窒素除去率が 80%前後と高く、週ごとの流入汚水の IN 負荷量がおおむね安定していた 2017 年 4–9 月を対象期間とし、窒素除去率が良好なときと 20 ポイント以上の急激な下降がみられたときの曝気槽内の水質の変動を比較し、窒素除去に影響を与える要因について解析を行った。曝気槽内の環境については、第 3 節 3.1.2 で示した水温、DO 濃度、pH および IN 濃度に加え、酸化還元電位 (ORP) を対象とした。ORP はポータブル測定器 HQ40 と ORP 電極 MTC10105 (Hach Co.) により測定した。それらに併せて、アナモックス反応の阻害要因とされる³⁰⁾ 遊離アンモニア (FA) および遊離亜硝酸 (FNA) 濃度について Anthonisen らの提唱する計算式³¹⁾により算出し、その影響について検討した。

4.2. 結果および考察

対象期間の週単位における水質等の変動を Fig. 2-4-1 に示す。期間中、窒素除去率が 20 ポイント以上急激に低下したケースは 5 回確認された。水温の変動は除去率の変動に影響を与えていなかった。除去率低下時における水質等の変動には DO 濃度および pH の推移により、2つのパターンが認められた。1つ目のパターンは 2 回確認され、このパターンでは DO 濃度が 0.5 mg/L 以上に上昇するとともに pH が 6.5 以下へと急激に下降し、いずれもこの槽におけるアナモックス反応の至適範囲を逸脱した。OPR は上昇傾向にあった。また、NO₂-N 濃度が 155 mg/L および 167 mg/L まで上昇したことに一致して FNA 濃度がそれぞれ 0.32

mg/L、0.58 mg/L と上昇した。窒素除去率を低下させる要因としては、DO 濃度、pH、水温がそれぞれアナモックス菌の至適範囲を外れた場合や、FA、FNA による阻害が考えられる³⁰⁾。基質の阻害濃度については様々な報告があり、一例として NO₂-N 濃度は 280 mg/L 以上³⁰⁾と比較的高濃度である一方、FNA においては 0.006–0.213 mg/L と低濃度で阻害をおこすとされる^{30) 32)}。このパターンにおいて窒素除去率が低下したときは、NO₂-N 濃度は阻害値以下であったものの、FNA 濃度については阻害値より高かった。以上のことから、このパターンにおいては、DO 濃度の上昇およびそれに伴う NO₂-N の蓄積による pH の低下が至適条件を逸脱したこと、および FNA 濃度の上昇によりアナモックス反応が阻害されたことで窒素除去率が低下したと判断された。

2つ目のパターンでは、DO 濃度は 0.15 mg/L 未満と低く維持されていたにもかかわらず、窒素除去率の大幅な減少が 3 回認められた。このパターンでは pH は 8.0–8.1 と上昇し、NH₄-N 濃度が急激に上昇するとともに FA がそれぞれ 8.1 mg/L、20.6 mg/L、26.7 mg/L に上昇した一方で、NO₂-N および NO₃-N は検出されなかった。NH₄-N は 1000 mg/L でもアナモックス反応を阻害しないとされる²⁰⁾が、FA においては 20–25 mg/L³³⁾または 13–90 mg/L³⁴⁾でアナモックスへの阻害が認められていることから、20 mg/L 以上まで上昇したパターンでは FA による阻害の可能性も示された。ORP にはやや下降傾向が認められた。これらのことから、このパターンにおいては曝気量の不足により NH₄-N の硝化が進まずアナモックス反応の基質である NO₂-N が律速となったことや、FA によるアナモックス反応の阻害により窒素除去率が低下したものと考えられた。

以上のことから、窒素除去率を安定させるには、DO 濃度を 0.3 mg/L 以下の低濃度に維持するとともに、pH を 6.5–8.0 の範囲で安定させるための運転コントロールが必要であることが明らかとなった。

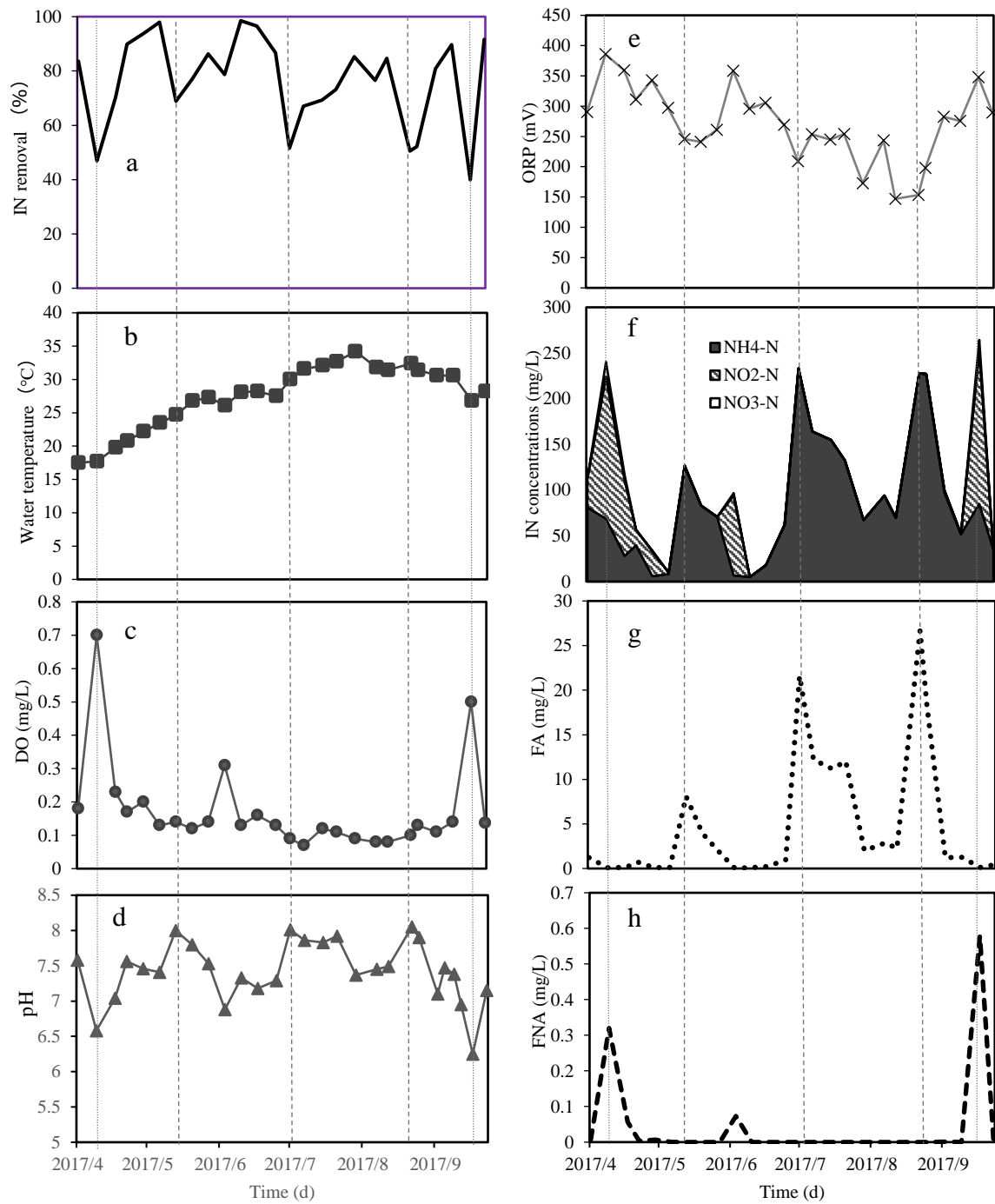


Fig.2-4-1. Comparison of water quality during the test period (a) inorganic nitrogen (IN) removal efficiency (b) water temperature (c) DO concentration (d) pH (e) ORP (f) IN concentrations (g) free ammonia (FA) concentration (h) free nitrous acid (FNA) concentration. The vertical dotted lines indicate the days when the nitrogen removal rate decreased by 20 points or more. Fine dotted line indicates the time when increase DO concentration $> 0.5\text{mg/L}$, and rough dotted line indicates the time when DO concentration $\leq 0.3\text{mg/L}$.

第5節 結言

アナモックス菌バイオフィルムの集積が確認された養豚廃水処理施設において、2年間にわたり、アナモックス菌の集積要因、窒素除去能の検討、窒素除去能に変動を与える要因について調査を行い、以下の知見を得た。

1. アナモックス活性測定と遺伝子学的検索により、壁面の赤いバイオフィルム、浮遊フロックおよびグラニュールに高濃度アナモックス菌が集積されていることを確認した。また優占種である *Candidatus Jettenia* が継続的に存在していることを確認した。
2. この施設の曝気槽においては、DO 濃度および pH がアナモックス菌の至適範囲内にあること、アナモックス反応の基質である $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ が存在すること、長い SRT (25 日以上) により増殖速度が約 11 日と遅いアナモックス菌を保持できること、曝気槽壁面がバイオフィルムの固定床として機能したことでアナモックス菌が集積されたものと判断された。
3. 水温は至適温度より低かったが、水温の低い3月に採取したグラニュールで高いアナモックス活性が確認された。冬季においても平均速度を超える高い無機態窒素除去速度が記録されたことから、低温期においてもアナモックス反応による窒素除去が行われている可能性が考えられた。
4. 流入水の BOD/TN 比が低く、従属栄養脱窒には不十分な条件であっても 70%以上の高い窒素除去率が確認された。これは、 $\text{NO}_2\text{-N}$ を経由するショートカット硝化脱窒に加えてアナモックス反応による窒素除去も行われているということを示しており、この施設では SNAD プロセスにより窒素除去が行われていると判断された。また、 $\text{NO}_3\text{-N}$ まで硝化が進んだ場合には窒素除去能が低下することも明らかとなった。
5. 週単位の窒素除去能力の変動と曝気槽内環境の関係から、窒素除去能力の急激な低下の要因を明らかにした。窒素除去速度の急激な低下には ① DO 濃度の上昇により硝化が促進され pH が下降するとともに FNA 濃度の上昇によるアナモックス反応の阻害、② DO 濃度の不足による硝化制限による $\text{NO}_2\text{-N}$ の律速、または pH 上昇に伴う FA 濃度の上昇によるアナモックス反応の阻害の 2 パターンが確認された。窒素除去率を安定させるには、DO 濃度を 0.3 mg/L 以下の低濃度に維持すると同時に pH を 6.5-8.0 の範囲で安定させるための運転コントロールが必要であることが明らかとなった。

第 2 章参考文献

- 1) Waki, M., Yasuda, T., Suzuki, K., Sakai, T., Suzuki, N., Suzuki, R., Matsuba, K., Yokoyama, H., Ogino, A., Tanaka, Y.: Rate determination and distribution of anammox activity in activated sludge treating swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 2685–2690 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.081>.
- 2) Suto, R., Ishimoto, C., Chikyu, M., Aihara, Y., Matsumoto, T., Uenishi, H., Yasuda, T., Fukumoto, Y., Waki, M.: Anammox biofilm in activated sludge swine wastewater treatment plants. *Chemosphere.* 167, 300–307 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.121>.
- 3) Waki, M., Ishimoto, C., Suto, R., Nagamine, T., Matsumoto, T., Uenishi, H., Yasuda, T., Fukumoto, Y.: An Analysis of Operation Conditions and Microbial Characteristics in Swine Wastewater Treatment Plants with Spontaneously Enriched Anammox Bacteria. *Processes.* 9, 1010 (2021). <https://doi.org/10.3390/pr9061010>.
- 4) Wang, C.-C., Lee, P.-H., Kumar, M., Huang, Y.-T., Sung, S., Lin, J.-G.: Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant. *J. Hazard. Mater.* 175, 622–628 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.052>.
- 5) Wang, X., Yang, R., Zhang, Z., Wu, J., Chen, S.: Mass balance and bacterial characteristics in an in-situ full-scale swine wastewater treatment system occurring anammox process. *Bioresour. Technol.* 292, 122005 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122005>.
- 6) van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G.: Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology.* 142, 2187–2196 (1996). <https://doi.org/10.1099/13500872-142-8-2187>.
- 7) Yoshinaga, I., Amano, T., Yamagishi, T., Okada, K., Ueda, S., Sako, Y., Suwa, Y.: Distribution and Diversity of Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) Bacteria in the Sediment of a Eutrophic Freshwater Lake, Lake Kitaura, Japan. *Microbes Environ.* 26, 189–197 (2011). <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10184>.
- 8) Schmid, M.C., Maas, B., Dapena, A., van de Pas-Schoonen, K., van de Vossenberg, 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., Strous, M.: Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1677–1684 (2005). <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1677-1684.2005>.
- 9) Zhang, T., Shao, M.-F., Ye, L.: 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.* 6, 1137–1147 (2012). <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.188>.
- 10) Magoč T. and Salzberg S. L.: FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27(21), 2957–2963 (2011). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- 11) Edgar R. C., Haas B. J., Clemente J. C., Quince C. and Knight R.: UCHIME improves sensitivity

- and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27(16), 2194-200 (2011). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>.
- 12) Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R.: Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624 (2012). <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.
 - 13) Bae, H., Park, K.-S., Chung, Y.-C., Jung, J.-Y.: Distribution of anammox bacteria in domestic WWTPs and their enrichments evaluated by real-time quantitative PCR. *Process Biochem.* 45, 323–334 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.10.004>.
 - 14) Pereira, A.D., Cabezas, A., Etchebehere, C., Chernicharo, C.A. de L., de Araújo, J.C.: Microbial communities in anammox reactors: a review. *Environ. Technol. Rev.* 6, 74–93 (2017). <https://doi.org/10.1080/21622515.2017.1304457>
 - 15) Tao, Y., Huang, X., Gao, D., Wang, X., Chen, C., Liang, H., van Loosdrecht, M.C.M.: NanoSIMS reveals unusual enrichment of acetate and propionate by an anammox consortium dominated by *Jettenia asiatica*. *Water Res.* 159, 223–232 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.006>.
 - 16) Volcke, E.I.P., Picioreanu, C., De Baets, B., van Loosdrecht, M.C.M.: The granule size distribution in an anammox-based granular sludge reactor affects the conversion—Implications for modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1629–1636 (2012). <https://doi.org/10.1002/bit.24443>.
 - 17) 公益社団法人日本下水道協会: 下水試験方法 (2012)
 - 18) Dosta, J., Fernández, I., Vázquez-Padín, J.R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Mata-Álvarez, J., Méndez, R.: Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *J. Hazard. Mater.* 154, 688–693 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.082>.
 - 19) Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., van der Meer, J.R., Zehnder, A.J.B.: Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* 175, 198–207 (2001). <https://doi.org/10.1007/s002030100255>.
 - 20) Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M.: Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3248–3250 (1999). <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.3248-3250.1999>.
 - 21) Kumar, M., Lin, J.-G.: Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal—Strategies and issues. *J. Hazard. Mater.* 178, 1–9 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.077>.
 - 22) Waki, M., Yasuda, T., Fukumoto, Y., Béline, F., Magrí, A.: Treatment of swine wastewater in continuous activated sludge systems under different dissolved oxygen conditions: Reactor operation and evaluation using modelling. *Bioresour. Technol.* 250, 574–582 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.078>.
 - 23) Sun, Y., Chen, Z., Wu, G., Wu, Q., Zhang, F., Niu, Z., Hu, H.-Y.: Characteristics of water quality of municipal wastewater treatment plants in China: implications for resources utilization and

- management. *J. Clean. Prod.* 131, 1–9 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.05.068>.
- 24) Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M.: The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 589–596 (1998). <https://doi.org/10.1007/s002530051340>.
 - 25) Osada, T., Haga, K., Harada, Y.: Removal of nitrogen and phosphorus from swine wastewater by the activated sludge units with the intermittent aeration process. *Water Res.* 25, 1377–1388 (1991). [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90116-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90116-8).
 - 26) 金主鉉、酒村哲郎、千葉信男、西村修、須藤隆一: 回分式間欠曝気活性汚泥法による豚舎排水の有機物・窒素除去に関するパイロットプラント実験 水環境学会誌, 22 (12), 990-996 (1999)
 - 27) Sun S.-P., Nàcher C. P. i., Merkey B., Zhou Q., Xia S.-Q., Yang D.-H., Sun J.-H. and Smets B. F.: Effective biological nitrogen removal treatment processes for domestic wastewaters with low C/N ratios: a review. *Environmental Engineering Science* 27(2), 111-126 (2010). <https://doi.org/10.1089/ees.2009.0100>
 - 28) Daverey, A., Hung, N.-T., Dutta, K., Lin, J.-G.: Ambient temperature SNAD process treating anaerobic digester liquor of swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 141, 191–198 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.045>.
 - 29) Liu, T., Ma, B., Chen, X., Ni, B.-J., Peng, Y., Guo, J.: Evaluation of mainstream nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a granule-based reactor. *Chem. Eng. J.* 327, 973–981 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.173>.
 - 30) Jin, R.-C., Yang, G.-F., Yu, J.-J., Zheng, P.: The inhibition of the Anammox process: A review. *Chem. Eng. J.* 197, 67–79 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.014>.
 - 31) Anthonisen A. C., Loehr R. C., Prakasam T. B. S. and Srinath E. G.: Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48(5), 835-852 (1976).
 - 32) Van Hulle, S.W.H., Vandeweyer, H.J.P., Meesschaert, B.D., Vanrolleghem, P.A., Dejans, P., Dumoulin, A.: Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chem. Eng. J.* 162, 1–20 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.05.037>.
 - 33) Fernández, I., Dosta, J., Fajardo, C., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R.: Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the Anammox process. *J. Environ. Manage.* 95, S170–S174 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.044>.
 - 34) Waki, M., Tokutomi, T., Yokoyama, H., Tanaka, Y.: Nitrogen removal from animal waste treatment water by anammox enrichment. *Bioresour. Technol.* 98, 2775–2780 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.031>.

第3章 小型試験装置を用いたアナモックス菌集積試験

第1節 緒言

第2章において、当センター養豚廃水処理施設の曝気槽内で集積されるアナモックス菌の集積要因について調査を行い、pH、DO濃度等の環境要因がアナモックス菌の至適範囲にあることや、アナモックス菌の基質であるNH₄-N及びNO₂-Nが存在すること等の要因がアナモックス菌の集積を可能にしていると判断された。曝気槽内でアナモックス菌を集積させ、SNADプロセスによる窒素除去を養豚廃水処理施設に適用することを検討するにあたっては、実際にこれらの条件を揃えることでアナモックス菌の集積が行われ、窒素除去能が向上することを確認することが重要である。

一般的にアナモックス菌は、無機人工培地を用いたりアクターで集積培養が行なわれており¹⁴⁾、有機質を豊富に含む養豚廃水を培地とした集積培養の事例は見当たらない。上記の条件を適用することにより養豚廃水でアナモックス菌の集積が可能であれば、既設の養豚廃水処理施設にこれらの条件を適用することでアナモックス菌の集積が可能となる可能性が示される。そこで、第2節ではフルスケール(FS)槽の曝気槽を模した小型試験装置を用い、第2章で明らかにした曝気槽内の条件を再現した環境下でのアナモックス菌の集積及び窒素除去について試験を行った。

また、SNADプロセスによる窒素除去を養豚廃水処理の現場に適用するにあたっては、冬季の水温低下時の窒素除去能を維持することが課題となる。低温期の対策としては、反応槽内のアナモックス菌量を増やすことが提唱されている⁵⁶⁾。そこで、第3節では小型試験装置の曝気槽内に不織布担体を増設し、槽内のアナモックス菌バイオマス量を増加させることによる窒素除去能力の向上の可能性について検証した。

第2節 曝気槽の環境を再現した小型試験装置によるアナモックス菌の集積

2.1. 試験方法

試験期間は2017年7月6日から2018年6月26までの1年間とした。小型試験装置の概略図をFig. 3-2-1に示す。装置は96Lの硬質塩化ビニール製の水槽を曝気槽とし、30Lの沈殿槽と組み合わせた連続処理式である。種汚泥には、1mmメッシュを通して浮遊グラニュールを除去したFS槽の活性汚泥を用いた。装置にはFS槽の調整槽から中継槽を経て採取した廃水を、流入汚水槽からペリスタポンプを用いて連続投入した。曝気槽のDO濃度は、試験開始日から2018年2月26日まではポータブル測定器HQ40dおよび蛍光式溶存酸素プローブLDO10105(Hach Co.)を用いて測定し、曝気量はエアポンプからの送風チューブにピンチバルブを設置してDO濃度が0.3mg/L以下の範囲におさまるように手動で調整した。2月26日(試験開始235日目)以降は、蛍光式溶存酸素計LDO2(Hach Co.)を用い、変換器sc200(Hach Co.)による逆フェーズのPID制御により、DO濃度上昇時には曝気を抑制し、下降時には曝気量を増やすようエアポンプの出力を自動制御した。pHは6.7-8.0の範囲におさまるように流入水量を増減することで調整した。汚泥の引き抜きは週1-2回程度、1回につき5L程度までとし、SRTを25日以上確保するようにした。11月中旬には水

温が 12 °C まで低下し、冬季に FS 槽より大幅に水温が低下することが危惧されたため、11 月 29 日から 4 月 30 日までの間は水中ヒーターを用い、水温をヒーターの最低設定温度の 18°C に維持した。曝気槽の水温、DO 濃度、pH、流入水および処理水中の無機態窒素濃度を週 2 回、全窒素濃度を週 1 回および BOD を月 2 回、第 2 章第 3 節に示した方法で測定した。

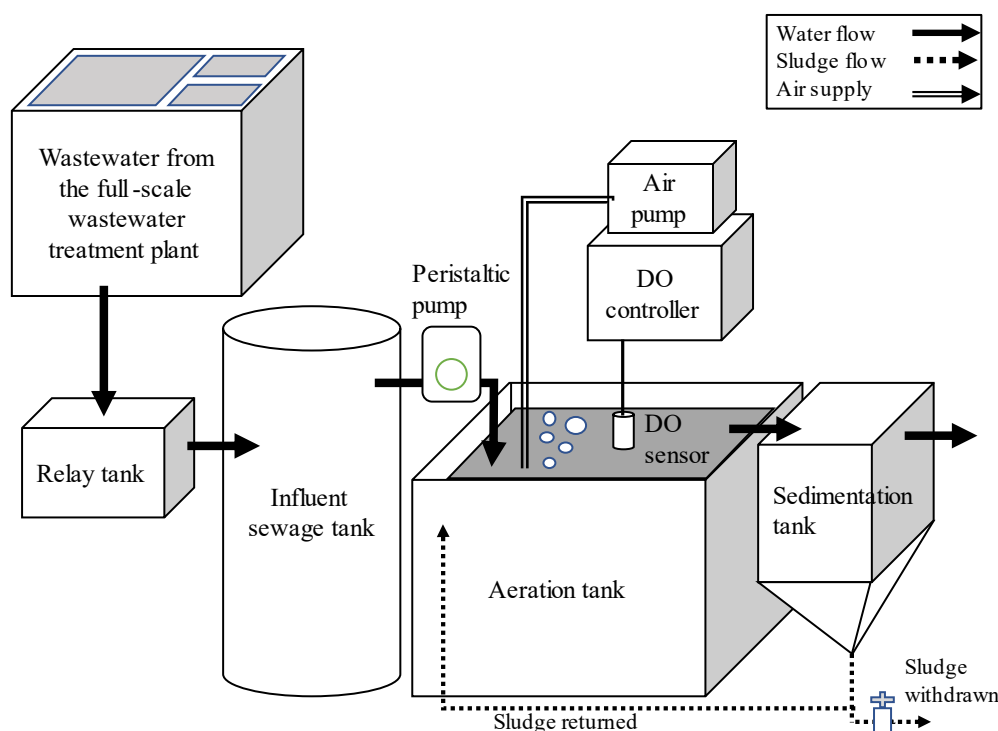


Fig. 3-2-1. Schematic diagram of the test plant. The DO controller was installed on February 26, 2018.

コンクリート製の FS 槽と異なり曝気槽の壁面が平滑であったことから、壁面に見立て、市販のポリプロピレン製の農業用不織布（ダイオ化成株式会社）を 33 cm 角の角網に巻き付けたもの（表面積 2178 cm²、Fig. 3-2-2）を担体として設置した。この担体は随時引き上げて汚泥の付着状況を目視で確認するとともに、試験終了時にリアルタイム PCR 分析により付着バイオフィームおよび浮遊汚泥のアナモックス菌 DNA 量を定量して増殖を確認した。リアルタイム PCR については、抽出および精製までは第 2 章と同じ方法で行った。DNA 濃度は NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific、USA) で測定し、サンプル濃度を調整した。1 検体あたり Sso Advanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 12.5 μL、プライマー各 0.15 μL、スタンダードまたはサンプル DNA 1.25 μL および滅菌蒸留水 10.95 μL の混合液 25 μL を反応液とし、96 ウェルプレートで 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems、USA) を用いて第 2 章に示した条件で増幅を行った。

供試廃水の水質を Table 3-2-1 に示す。中継槽では攪拌を行わなかったため汚水の SS が沈殿し、その影響で流入汚水槽に流入する廃水の BOD 濃度は FS 槽よりやや低い値となった。曝気槽内の MLSS 濃度は 11840 ± 1880 mg/L とおおむね FS 槽と同等で運転した。

Table 3-2-1. Characteristics of influent.

	Means \pm S.D.
Wastewater inflow (L/d)	28 \pm 8
BOD (mg/L)	934 \pm 410
Total nitrogen (mg/L)	631 \pm 178
BOD / TN ratio	1.5 \pm 0.6
Total inorganic nitrogen (mg/L)	513 \pm 90
NH ₄ -N (mg/L)	513 \pm 90
NO ₂ -N (mg/L)	0
NO ₃ -N (mg/L)	0

※BOD and TN are data from September to June.



Fig. 3-2-2. Non-woven fabric wrapped around a wire mesh frame as a biomass carrier.

2.2. 結果及び考察

試験期間中における水質等の推移を Fig. 3-2-3 に示す。試験期間中の水温は 15–29°C で推移し (Fig. 3-2-3a)、平均水温は 22.7 ± 4.4 °C で、FS 槽の平均水温とおおむね同程度に維持された。DO 濃度は 3–4 月の間が不安定に推移した (Fig. 3-2-3b) が、これは槽内に固定された DO センサー表面にバイオフィルムが付着した影響によるものであった。センサーの清掃を頻繁に行うことにより以降の DO 濃度は 0.3 mg/L 以下で安定し、平均 DO 濃度は 0.24 ± 0.15 mg/L と低値で維持された。また、pH は 5–6 月にかけて薄い汚水の流入や送水チューブの詰まりなどのアクシデントで急激な下降もおこったが、それ以外では大幅な変動はなく、pH の平均値は 7.2 ± 0.5 に維持された。すなわち、槽内環境はおおむね FS 槽で示されたアナモックス菌の至適条件とほぼ同じ条件で維持することができた。処理水の平均濃度は NH₄-N が 43 ± 46 mg/L、NO₂-N が 15 ± 23 mg/L、NO₃-N が 35 ± 41 mg/L であり、FS 槽と同様に NH₄-N と NO₂-N の存在は確保されたが、FS 槽に比較して NO₃-N の濃度が高い期間が多く認められた (Fig. 3-2-3c)。流入水の BOD/TN は 1.5 ± 0.6 と低く、従属栄養脱窒には不利な条件下にあったが、TN および IN 除去率はそれぞれ $80 \pm 12\%$ 、 $81 \pm 12\%$ といずれも良好であった。試験期間中における BOD 除去率は $96 \pm 3\%$ で、FS 槽と同様に汚水の処理は良好に行われていた。

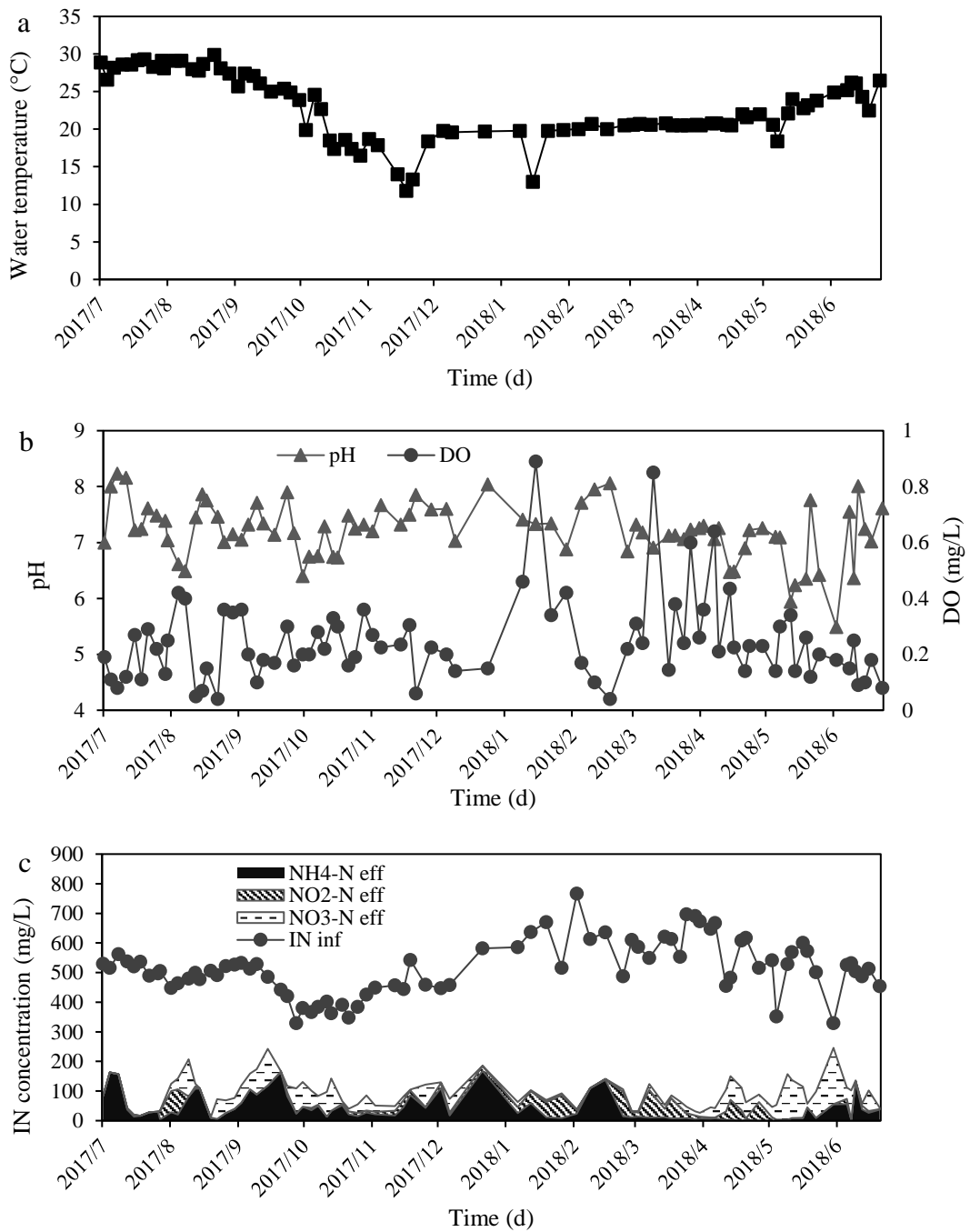
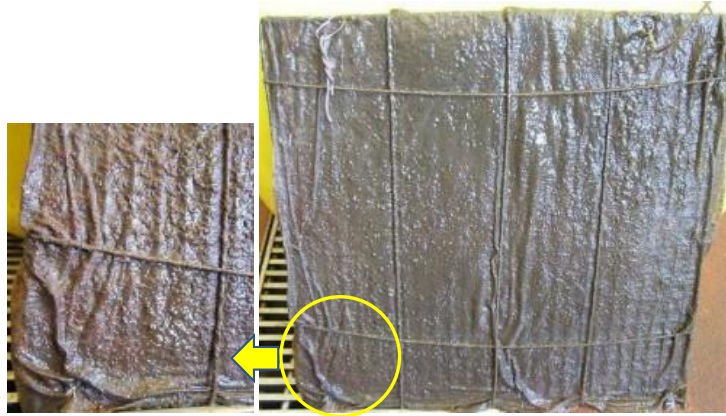


Fig. 3-2-3. Time course of water quality in the aeration tank (a) water temperature (b) pH and DO (c) IN concentrations in influent and effluent.

担体の赤色バイオフィルムの生育状況を Fig. 3-2-4 に示す。試験開始 174 日目の 12 月 27 日に、担体の一部に赤色のバイオフィルムが付着していることが確認された。試験開始 224 日目の 2 月 15 日には担体の全体が赤いバイオフィルムで覆われ、バイオフィルムの表面にはグラニュー様塊の形成も確認された。さらに、曝気槽の壁面の一部に黒色のスケールが付着し、その表面に赤色バイオフィルムが発生していた。

Day 174 (Dec. 27, 2017)
Partial development of red
biofilm was observed.



Day 224 (Feb. 15, 2018)
Entire area covered with red
biofilm, and some granule -
like structures were found
on the surface.

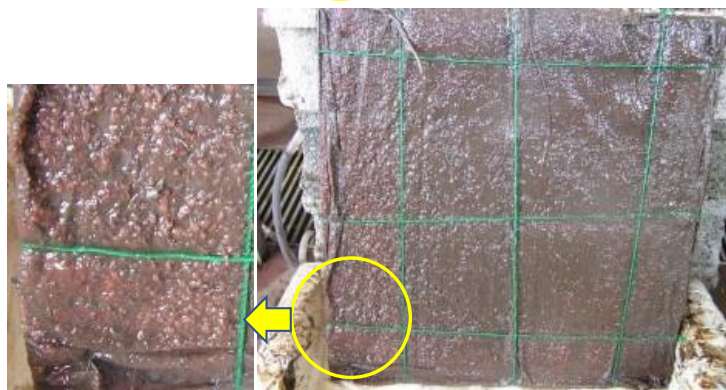


Fig. 3-2-4. Emerged red biofilm on a biomass carrier of non-woven fabric. Strings used to fix the non-woven fabric were broken in the middle of the test, so retied with another strings.

試験終了時におけるアナモックス菌 DNA 量の比較を Fig. 3-2-5 に示す。浮遊汚泥では 2.0×10^8 copies/g-IL であったのに対し、壁面および担体の付着バイオフィームではそれぞれ 4.7×10^{11} copies/g-IL、 8.7×10^{11} copies/g-IL のアナモックス菌 DNA が検出され、バイオフィームにアナモックス菌が高度に集積されていることが確認された。活性汚泥を用いたアナモックス菌の集積培養では、担体を用いた連続式リアクターにおいて、 25°C で約 1 年¹⁾、 20°C で約 400 日²⁾後に赤色バイオフィームの発生が確認されているが、今回の試験ではこれらの報告より短期間で集積が確認された。これらのことから、目視で集積は認められないがリアルタイム PCR 分析などで活性汚泥中にアナモックス菌の存在が確認された養豚廃水処理施設においては、その活性汚泥を種汚泥として用い、pH や DO 濃度などを第 2 章で示した条件に合わせた運転を行うことでアナモックス菌の集積を行なうことができる可能性が示された。

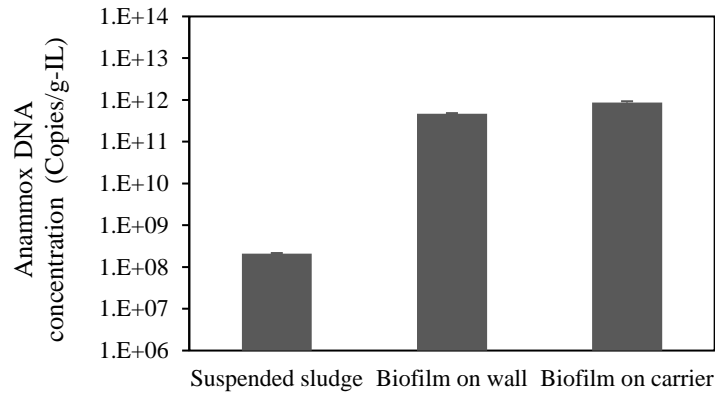


Fig. 3-2-5. Comparison of the amount of anammox 16S rRNA concentration at the end of the test.

試験期間中の IN 負荷量と除去速度の推移を Fig. 3-2-6 に示す。IN 負荷量は赤色バイオフィームが確認された 12 月以降は増加に転じた。5 月と 6 月に見られる一過性の急激な低下は流入水チューブの詰まりによるものである。試験開始時の IN 除去速度は 0.12 kg-N/m³/day であったが、アナモックス菌バイオフィームが確認された 12 月以降は上昇に転じ、試験開始 371 日（6 月 28 日）には最高速度 0.22 kg-N/m³/day を記録した。

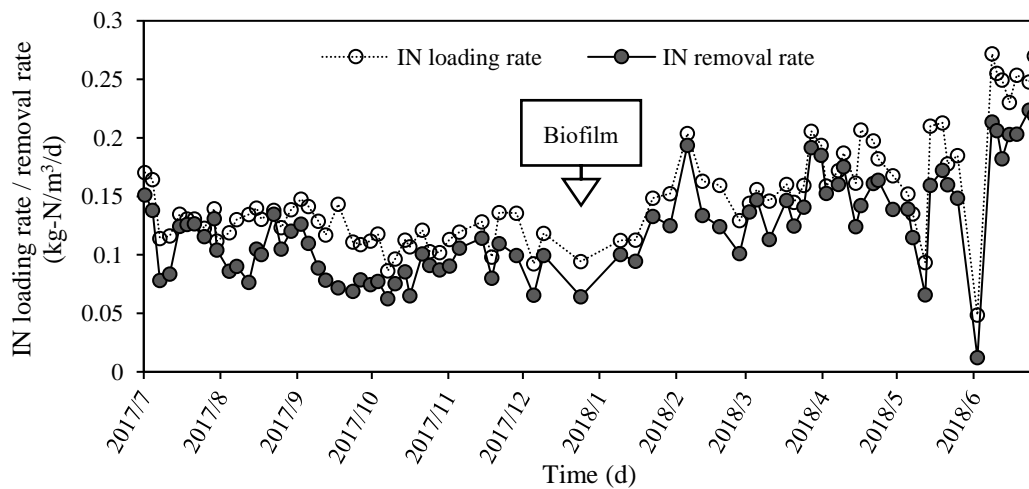


Fig. 3-2-6. Changes in nitrogen loading and nitrogen removal rates during the test period. ‘Biofilm’ indicated by the arrow indicates the date when the red biofilm was observed on the carrier.

以上のことから、アナモックス菌の至適条件にある曝気槽の環境を再現することで、養豚廃水を処理する小型装置でアナモックス菌が集積され、SNAD プロセスによる窒素除去が可能となることが確認された。

第3節 担体増設による窒素除去能力向上の検討

3.1. 試験方法

第3章第2節で用いた小型試験装置を引き続いて試験に用いた。試験期間は第2節の試験を行った2017年7月6日から2018年6月28日までを1年目 (day 0–357)、それに続く2018年7月3日から2019年6月28日までを2年目 (day 362–722) とした。運転条件および測定項目は第2節と同様に設定した。2年目においては、水温が10℃以下まで低下した2019年1月9日から3月11日までヒーターによる加温を行った。

曝気槽内の担体の設置状況を Fig. 3-3-1 に示す。第2節 2.1 で設置した自作の不織布担体 (担体 1) に加え、2018年6月22日に菊花型の不織布担体 (パシフィック技研株式会社、長さ33 cm、表面積2508 cm²) を2基追加し、これらを担体 2-1、2-2 とした。担体 2 は、それぞれ下部に重りを付け、曝気槽内に紐で垂下した。担体上のアナモックスバイオフィルムの集積の確認は、第2節と同様に目視及びリアルタイム PCR 分析を用いたアナモックス菌 DNA の定量により行った。

低温期については、1年目は2017年11月–2018年4月 (1st year)、2年目は2018年11月–2019年4月 (2nd year) の期間を対象とし、水質および窒素除去速度について t-検定または Wilcoxon の順位和検定を用いて比較を行った。

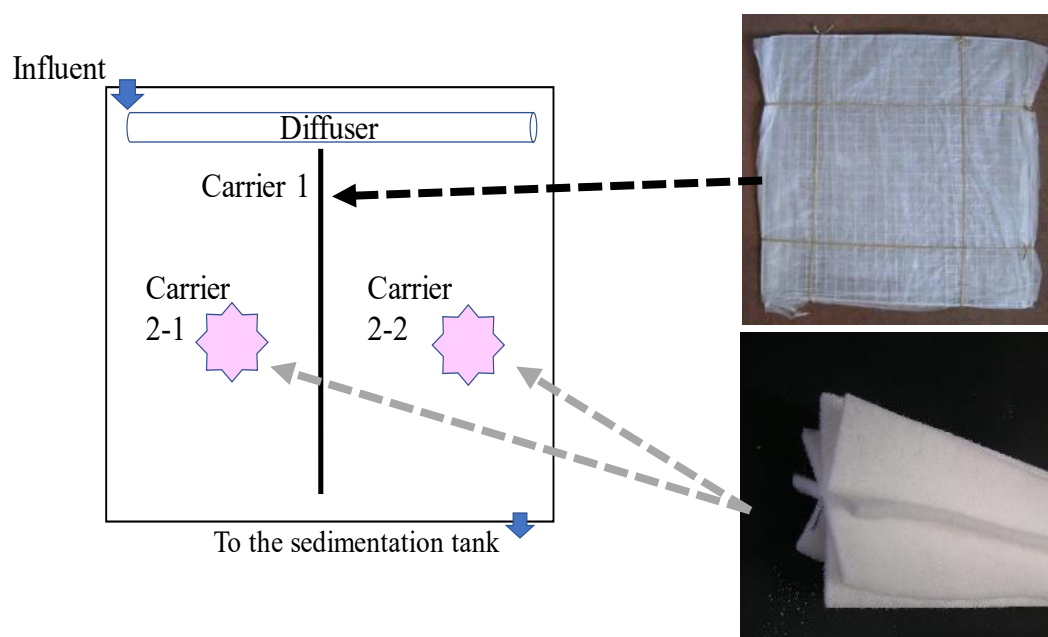


Fig. 3-3-1. Schematic diagram of the installation of each carrier in the aeration tank.

Carrier 1: non-woven fabric wrapped around a wire mesh frame settled on Jul. 6, 2017.

Carrier 2: non-woven fabric biomass carrier settled on Jun. 22, 2018.

供試廃水の水質を Table 3-3-1 に示す。BOD は 2 年目が 1 年目より有意に低かった ($P < 0.01$) が、TN 濃度に有意差は認められなかったため、BOD/N 比は 2 年目が低くなった。汚水投入量は 2 年目が有意に上昇した。

Table 3-3-1. Water quality in influent of each test period. Means \pm SD.

Water quality	Test period	
	1st year Day 0-357	2nd year Day 362-722
Inflow rate (L/d)	28 \pm 8	54 \pm 8
BOD (mg/L)	934 \pm 410	597 \pm 265
TN concentration (mg/L)	631 \pm 178	601 \pm 165
BOD / TN ratio	1.5 \pm 0.6	1.0 \pm 0.4
TIN concentration (mg/L)	513 \pm 90	520 \pm 83
NH ₄ -N (mg/L)	513 \pm 90	520 \pm 83
NO ₂ -N (mg/L)	0	0
NO ₃ -N (mg/L)	0	0

3.2. 結果および考察

試験期間における廃水処理状況を Table 3-3-2 に示す。BOD、TN および IN の除去率は 1 年目、2 年目ともに良好であり、有意差は認められなかった。また、処理水中の IN 組成にも差は認められなかった。

Table 3-3-2. Comparison of the water quality in effluent and removal efficiency. Means \pm SD.

Water quality	1st year		2nd year	
	Concentration (mg/L)	Removal (%)	Concentration (mg/L)	Removal (%)
BOD	31 \pm 16	96 \pm 3	44 \pm 37	93 \pm 7
TN	122 \pm 72	80 \pm 12	141 \pm 103	77 \pm 16
TIN	93 \pm 51	81 \pm 12	110 \pm 69	78 \pm 14
NH ₄ -N	43 \pm 46	-	54 \pm 54	-
NO ₂ -N	15 \pm 23	-	19 \pm 28	-
NO ₃ -N	35 \pm 41	-	36 \pm 53	-

試験期間全体における槽内環境の推移を Fig. 3-3-2 に示す。水温は 9–32 °C の間で推移し、平均水温は 22.6 \pm 4.9 °C であった (Fig 3-3-2a)。平均 DO 濃度は 0.24 \pm 0.13 mg/L であった (Fig 3-3-2b)。濃度の薄い汚水の流入などにより pH が 6.5 以下に低下する日も散見されたが、低下時には汚水投入量を増やす対応を行ったことにより、平均 pH は 7.2 \pm 0.6 に維持された。これらのことから、pH はやや低かったものの、槽内環境はおおむね FS 槽で示された至適条件範囲内で推移し、FS 槽とほぼ同じ条件に維持されたと判断した。

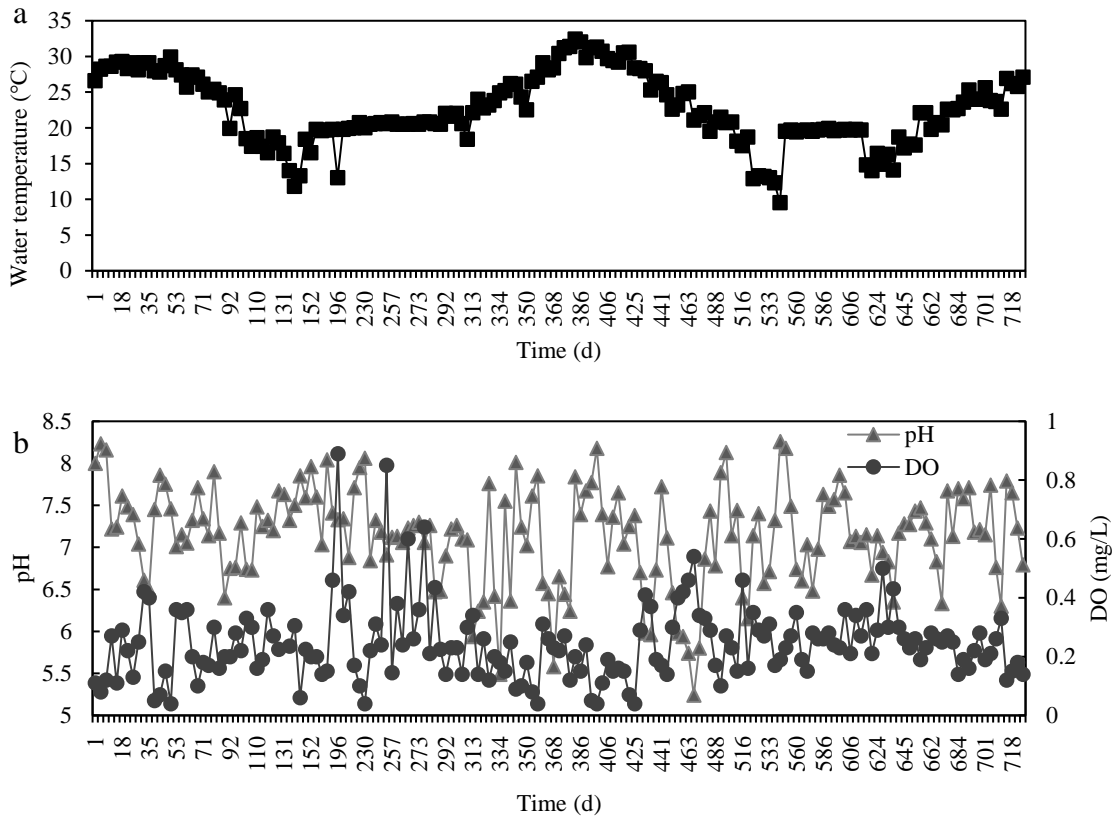


Fig. 3-3-2. Conditions in the aeration tank (a) water temperature (b) pH and DO concentration.

担体 2 におけるアナモックス菌の赤色バイオフィームは、設置から 142 日目にあたる 11 月 11 日に発生が確認され、担体 1 における発生確認までの経過よりもやや早かった。これは担体 1 の存在により、槽内のアナモックス菌バイオマス量が担体 1 のスタートアップ時より多かったことによるものと考えられた。試験 642 日目における各担体の赤色バイオフィーム発生状況を Fig.3-3-3 に示す。担体 2-1 と 2-2 では、担体 1 より褐色の汚泥の付着が多かったが、担体の表面に赤色のグラニュール様の塊が発生していた。バイオフィームのアナモックス菌 DNA 量は、担体 1 が 1.66×10^{11} copies/g-VSS、担体 2-1 が 1.34×10^{11} copies/g-VSS、担体 2-2 が 1.73×10^{11} copies/g-VSS で、いずれの担体にもほぼ同程度にアナモックス菌の集積が確認された。

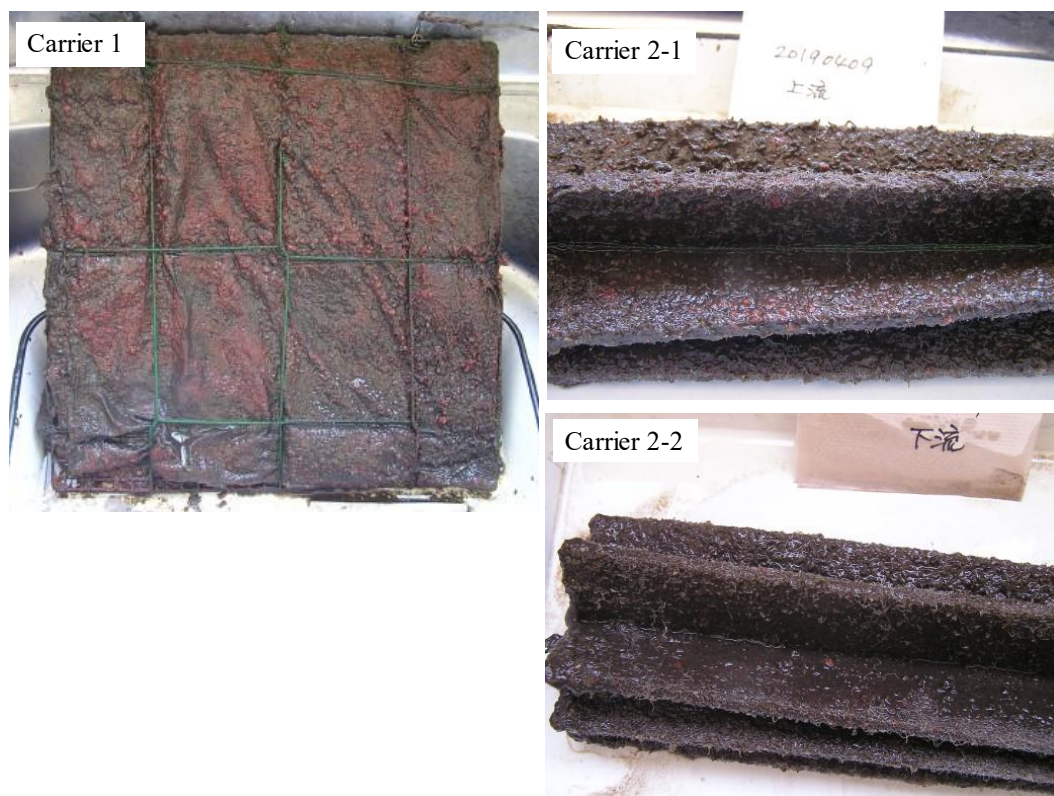


Fig. 3-3-3. Red biofilm of anammox bacteria accumulated on each biomass carrier on day 642 (Apr. 9, 2019).

試験期間中における IN 濃度の推移を Fig. 3-3-4a に、IN 負荷量と除去速度の推移を Fig. 3-3-4b に示す。それぞれの担体上に赤色バイオフィルムが確認された頃から IN 負荷量および除去速度が上昇し、701 日目には最高除去速度 $0.37 \text{ kg-N/m}^3/\text{d}$ を達成した。これは、担体に付着したバイオマス量の増加により窒素の処理量が増加したものと判断された。なお、431 日目から 467 日目にかけて IN 除去速度の低下が認められた。この期間は汚水流入チューブが詰まるアクシデントが頻発し、DO 濃度の上昇とともに pH が 6.0 未満まで大幅に下降した。処理水中には $\text{NO}_2\text{-N}$ が検出されなかった一方で、高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ が蓄積していたことから、負荷が低下したことで DO が余剰となり硝化が進んだものと考えられた。この期間の IN 除去速度の低迷は、pH がアナモックス菌の至適範囲を下回ったことや、アナモックス反応の基質である $\text{NO}_2\text{-N}$ が律速となったことでアナモックス反応が阻害された可能性に加えて、流入水の BOD/N 比が低く従属栄養脱窒に十分な炭素源が存在しなかったことで脱窒が進まなかったことが原因と考えられた。SNAD プロセスにおいては、アナモックス菌と $\text{NO}_2\text{-N}$ の利用において競合関係にある NOB の活性を抑制することが重要とされる⁷⁻⁹⁾。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が上昇したときに窒素除去速度が低下する現象は第 2 章第 3 節における FS 槽でも確認されており、 $\text{NO}_3\text{-N}$ まで硝化を進めることは窒素除去能の低下につながるということが再確認された。

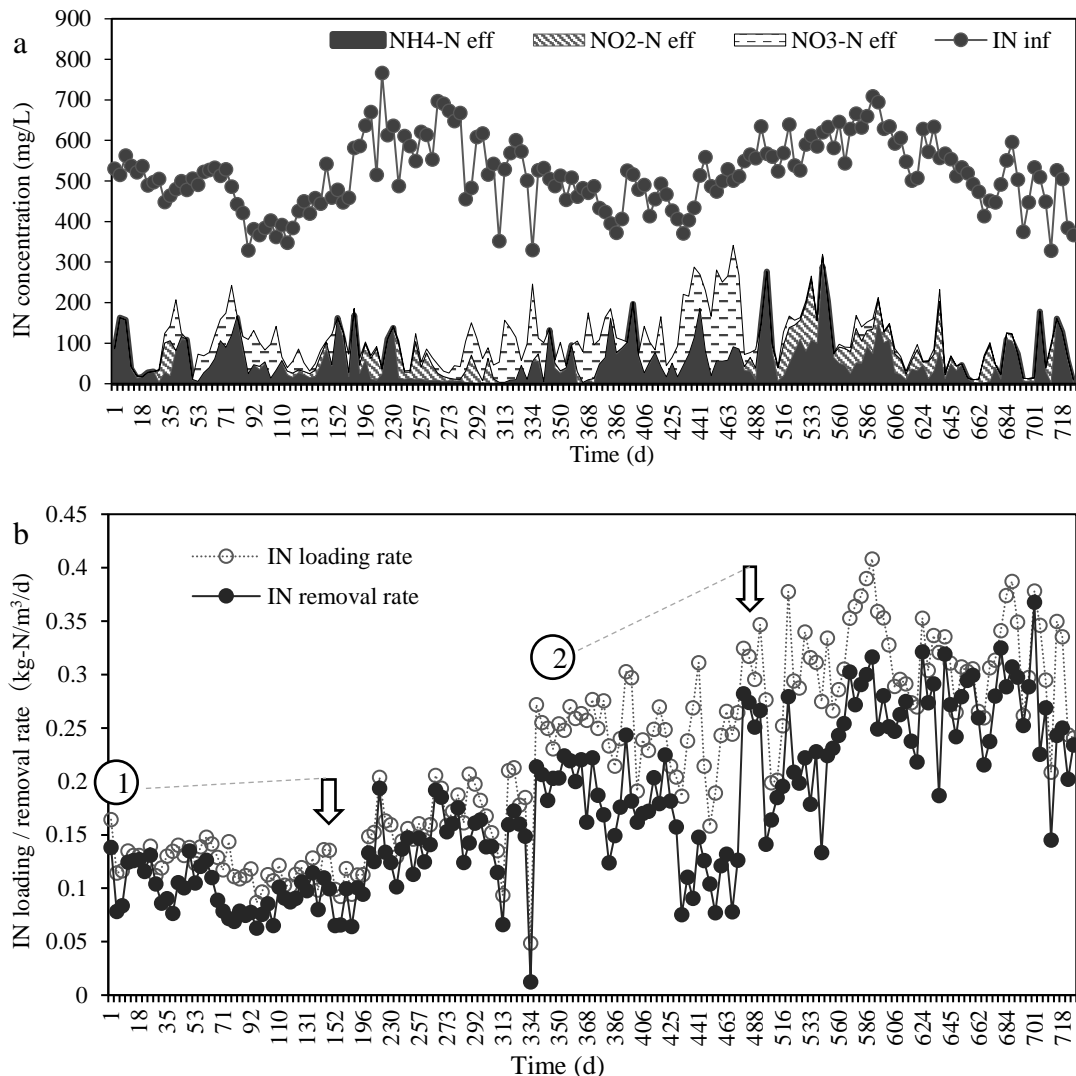


Fig. 3-3-4. Changes in inorganic nitrogen (IN). (a) IN concentration in influent and effluent (b) loading and removal rates. The circled numbers indicate the time of installation of each carrier, and the downward arrows indicate the time when red biofilm was visually observed on each carrier.

低温期における水温、pH、DO濃度、IN負荷量およびIN除去速度の比較を Fig. 3-3-4 に示す。水温は1年目が19.1℃、2年目が17.9℃で、加温期間の短かった2年目の平均水温が有意に低かった ($p < 0.05$)。pHおよびDO濃度には有意差を認めなかった。IN負荷量およびIN除去速度はいずれも2年目が高く、IN除去速度はそれぞれ 0.13 ± 0.04 kg/m³/day、 0.25 ± 0.05 kg/m³/dayであり、2年目のIN除去速度の有意な上昇が認められた ($p < 0.01$)。IN除去率は1年目が84.5%、2年目が80.7%で有意差は認められなかった。2年目は1年目よりBOD/N比が低く、従属栄養脱窒にはさらに不利な状況であったにもかかわらず窒素除去速度の向上が認められたことは、担体で増殖したアナモックス菌の寄与が大きかったものと判断された。

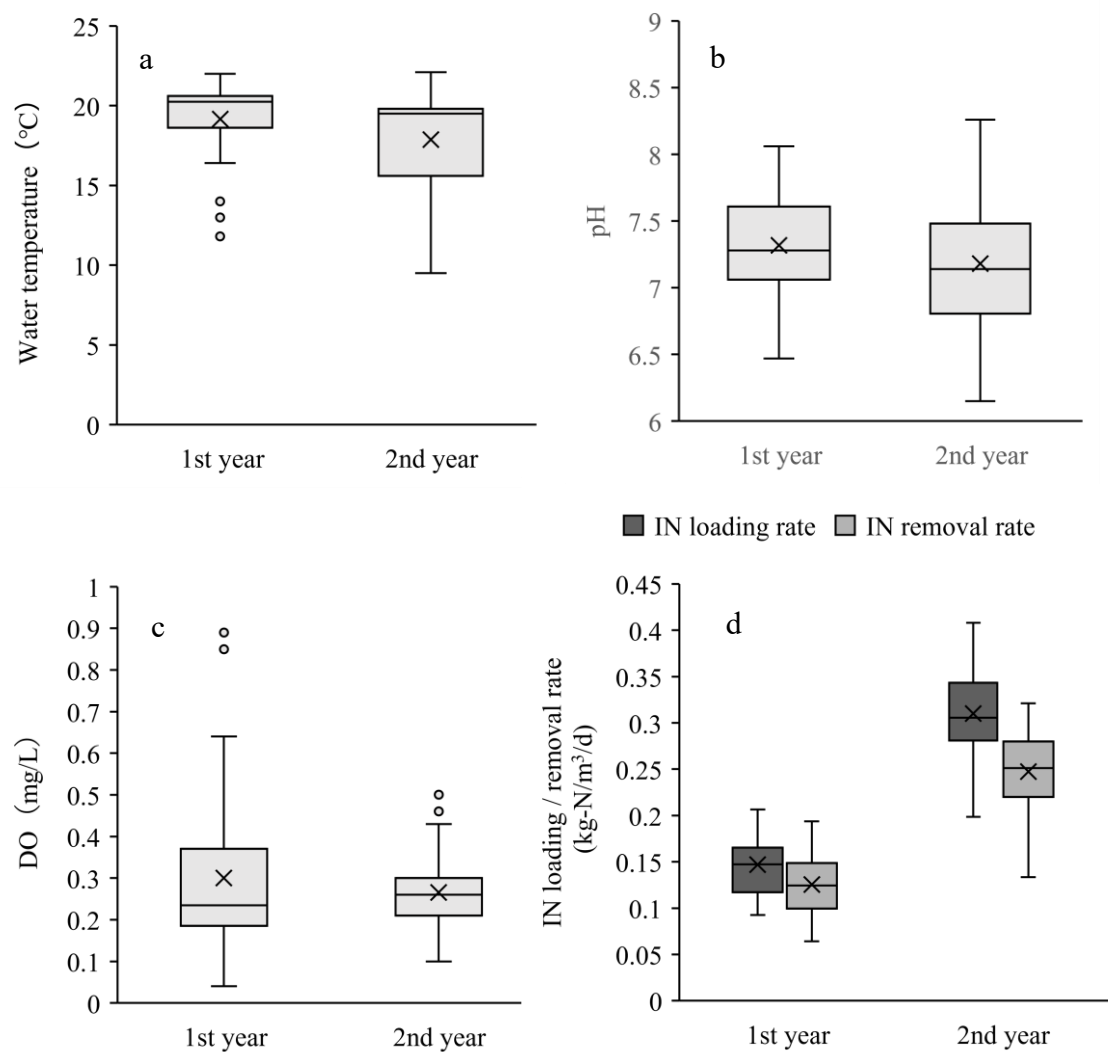


Fig. 3-3-4. Comparison of water characteristics and nitrogen removal during the comparison period of low temperature. (a) Water temperature (b) pH (c) DO concentration (d) inorganic nitrogen loading rate and removal rate.

以上のことから、2年目においては槽内に保持するバイオマス量の増加により、窒素負荷量および窒素除去速度を上昇させることができたと判断され、低温期にバイオマス量を増やすことの有効性が確認された。

なお、今回の試験では集積試験に実績のあった不織布担体¹⁾²⁾を用いたが、担体2については試験開始時の現物重量93gに対し、試験終了時には平均湿重量が730gまで増加した。仮にFS槽にこの担体を設置した場合、単純計算では1mあたり約2200gの重量となるため、担体が多いほど重量が重くなり、設置やメンテナンスが困難になると考えられる。従って、担体の設置にあたっては、アナモックス菌バイオフィームを選択して付着させて単位当たりの重量を軽くできる担体の種類についてさらに検討を重ねる必要がある。

第4節 結言

アナモックス菌が集積される曝気槽の環境を模した小型試験装置により、アナモックス菌の集積試験を試み、次の知見を得た。

1. FS 槽でのアナモックス菌の増殖要因と判断された条件を小型試験装置内で再現することで、FS 槽の活性汚泥を種菌として、養豚廃水でアナモックス菌が集積されることを確認した。これにより FS 槽で確認された条件がアナモックス菌の集積要因であることを明らかにした。また、アナモックス菌の集積により SNAD プロセスによる窒素除去が可能となることを確認した。NO₃-N まで硝化が進むと、窒素除去速度が低下することを再確認した。
2. 曝気槽内のアナモックス菌バイオマス量を増やすことで、窒素処理量および窒素除去速度が上昇することを確認した。低温期の窒素除去能は、槽内のバイオマス量を増やすことで向上できる可能性が示された。

第3章参考文献

- 1) Furukawa K., Rouse J.D., Imajo U. Nakamura K., Ishida H.: Anaerobic oxidation confirmed in continuous flow treatment using a non-woven biomass carrier. *Jpn. J. water treat. Biol.* 38, 87-94 (2002)
- 2) Park, G., Teshima, N., Nakayama, Y., Takekawa, M., Soda, S., Ike, M., Isaka, K., Furukawa, K.: Startup of Lab-scale Anammox Reactors Seeded with Activated Sludge at Ambient Temperature. *Jpn. J. Water Treat. Biol.* 52, 73–83 (2016). <https://doi.org/10.2521/jswtb.52.73>.
- 3) Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M.: The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 589–596 (1998). <https://doi.org/10.1007/s002530051340>.
- 4) Viancelli, A., Kunz, A., Esteves, P.A., Bauermann, F.V., Furukawa, K., Fujii, T., Antônio, R.V., Vanotti, M.: Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54, 1035–1041 (2011). <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000500022>.
- 5) Dosta, J., Fernández, I., Vázquez-Padín, J.R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Mata-Álvarez, J., Méndez, R.: Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *J. Hazard. Mater.* 154, 688–693 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.082>.
- 6) Hwang, I.S., Min, K.S., Choi, E., Yun, Z.: Nitrogen removal from piggery waste using the combined SHARON and ANAMMOX process. *Water Sci. Technol.* 52, 487–494 (2005). <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0727>.
- 7) Li, J., Li, J., Gao, R., Wang, M., Yang, L., Wang, X., Zhang, L., Peng, Y.: A critical review of one-stage anammox processes for treating industrial wastewater: Optimization strategies based on key functional microorganisms. *Bioresour. Technol.* 265, 498–505 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.013>.
- 8) Liu, T., Ma, B., Chen, X., Ni, B.-J., Peng, Y., Guo, J.: Evaluation of mainstream nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a granule-based reactor. *Chem. Eng. J.* 327, 973–981 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.173>.
- 9) Zhang, F., Peng, Y., Miao, L., Wang, Z., Wang, S., Li, B.: A novel simultaneous partial nitrification Anammox and denitrification (SNAD) with intermittent aeration for cost-effective nitrogen removal from mature landfill leachate. *Chem. Eng. J.* 313, 619–628 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.105>.

第4章 集積されたアナモックス菌の低温への適応の検証

第1節 緒言

屋外にある養豚廃水処理施設に加温の設備はなく、曝気槽の水温は季節により大きく変動する。一般的に微生物の活性は水温の低下に伴い低下する。Daverey ら¹⁾は豚廃水の嫌気消化液を処理するラボスケールの SNAD プロセスでは 15–20 °C で TN 除去率が 50% 未満に低下したことから、安定した SNAD プロセスの構築には 20 °C 以上を必要とすると報告している。また、埋立地の浸出液を処理するベンチスケールの SNAD プロセスでは、15 °C の温度に順応するのに 370 日以上を要した²⁾ことが報告されている。

一方、今回の研究対象とした養豚廃水処理施設では、第2章で示したとおり、年間の水温が 10–34 °C と大きく変動するにもかかわらず、BOD および TN の除去率はそれぞれ 95 ± 4%、75 ± 14% と年間を通して安定しており、冬季に平均速度を超える高い IN 除去速度も記録されている。加温を行わない環境下で SNAD プロセスを維持するためには、低温で高い窒素除去が得られる仕組みを明らかにすることが重要である。

この施設では、特に低温の冬季から春季にかけて、沈殿槽に大量の赤色グラニュールが浮上する現象が観察される。グラニュールの浮上はアナモックス反応に伴う窒素ガスが内部に蓄積することに起因する³⁾⁴⁾ことから、アナモックス菌が低温下において活性を保持している可能性が考えられる。アナモックス菌の至適温度は 30–37 °C⁵⁻⁷⁾とされるが、Park ら⁸⁾は、20 °C で培養した汚泥は、35 °C で培養した汚泥よりもアナモックス活性の至適温度が低かったことを報告している。Hu ら⁹⁾は、硝化-アナモックスリアクターの培養温度を 25 °C から 12 °C に変更したところ、最大アナモックス活性を示す温度が 35 °C から 25 °C にシフトしたことを報告した。Jin ら¹⁰⁾は、低温に適応させたアナモックス汚泥は、適応していないアナモックス汚泥よりも低温で高いアナモックス活性を示すことを明らかにした。また、Isaka ら¹¹⁾は、ゲル状の担体に入れたアナモックス菌の活性が、20 °C 以下でも 130 日以上安定していたことを報告している。これらの研究は、アナモックス細菌が低温に適応し、加熱システムを必要とせずに廃水の窒素除去に大きく貢献することを示唆している。アナモックスプロセスにおいては、水温の低下に伴いアナモックス菌種が変化した報告¹²⁾¹³⁾がある一方で、菌種に変化はなかったという報告もある⁹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。これらのことから、アナモックス菌の低温への適応には、温度によって優占する菌種が変化する可能性や、年間を通して広い温度範囲で高い活性を持つ特定の優占種が存在する可能性などが考えられる。

本章では、アナモックス菌の低温への適応を検証する目的で、第2節では低温期にアナモックス菌グラニュールが浮上する現象に着目し、その浮上要因について検証を行った。第3節では、四半期ごとに採取したグラニュールのアナモックス活性と温度の関係を解明するための試験を行い、水質調査の結果と合わせてアナモックス菌の低温への適応の可能性および窒素除去に与える影響について検討した。第4節では、遺伝子解析によりグラニュールのアナモックス菌および窒素除去プロセスに関与する菌叢の特徴を明らかにすることを試みた。

第2節 低温期におけるグラニューールの浮上要因の検証

2.1. 試験方法

第2章の試験期間である2016年4月から2017年8月において、沈殿槽に浮上するグラニューールの有無を目視で確認した。沈殿槽から採取した浮遊グラニューールを Fig. 4-2-1 に示す。また、月に1回、曝気槽から活性汚泥5Lを採取して1mmメッシュでろ過し、分離された赤色グラニューールの重量を測定して浮遊グラニューール量の推移を確認した。グラニューールは105℃で2時間乾燥し、乾重量として測定した。曝気槽内の水質については、第2章に示す方法で測定した。

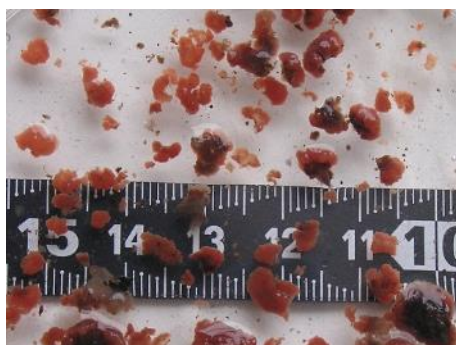


Fig. 4-2-1. Floating granules collected from the first sedimentation tank.

2.2. 結果および考察

グラニューールの浮上が観察された日と、曝気槽内のIN濃度および水温の推移を Fig. 4-2-2 に示す。グラニューールの浮上は、夏～秋季にかけては散発的であったが、冬～春季にかけて頻繁に浮上が観察された。アナモックスグラニューールが浮上する低温期にはNH₄-N濃度とともにNO₂-N濃度の上昇が認められた。このことから、低温であってもアナモックス反応の基質が豊富に存在するときにグラニューールが浮上することが明らかとなった。

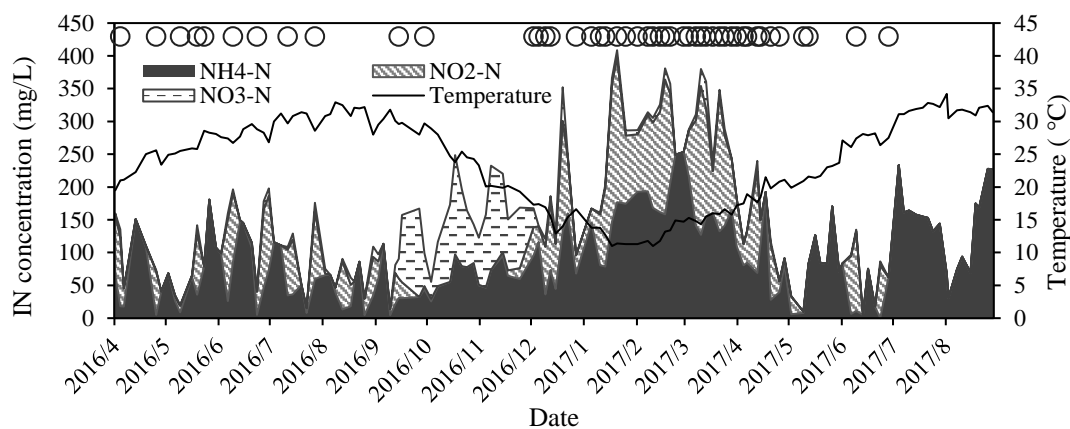


Fig. 4-2-2. Time course in water temperature and inorganic nitrogen concentration in the aeration tank. 'o' indicates the day when the granule floated in the first sedimentation tank.

曝気槽内に浮遊するグラニューール量と月平均窒素濃度の推移を Fig. 4-2-3 に示す。グラニューール量は浮上が頻繁に観察される冬季から上昇し、5月に最大となった。グラニューールの浮上の減少とともに浮遊量も減少に転じ、秋季に最小となった。

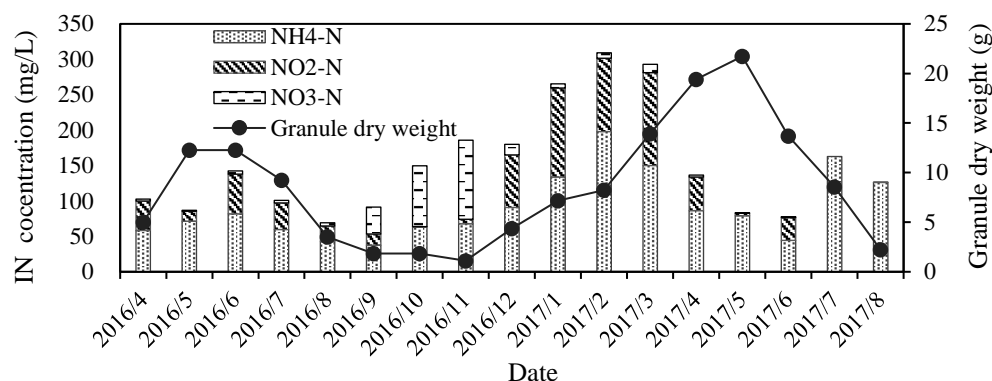


Fig. 4-2-3. Changes in monthly average IN concentration and the dry weight of granules suspended in the aeration tank.

以上のことから、グラニューールの浮上は冬季から春季にかけて基質が豊富に存在し、アナモックス反応によって発生した窒素ガスによって曝気槽壁面のバイオフィルム上に形成されたグラニューールが剥離して浮上することで発生し、それに伴い、曝気槽内の浮遊グラニューールが増加するものと考えられた。また、第2章2.2.1の試験で高い活性を示した浮上グラニューールも3月に採取されたものであったことから、低温期に存在するグラニューールは高い活性を持つ可能性があることが示された。

第3節 浮遊グラニューールのアナモックス活性および水質の四半期別比較

3.1. 試験方法

3.1.1. 水質測定

試験期間を2018年11月1日から2019年10月4日までの1年間とし、4半期(Q)ごとに、11月-1月(QL-1)、2月-4月(QL-2)、4月-7月(QH-1)、7月-10月(QH-2)と分割した。「L」は低温の期間を、「H」は高温の期間を示す。水質は、第2章で述べた項目について、同様の方法より測定を行った。また、TN濃度からIN濃度を差し引いて有機窒素(orgN)濃度を算出した。各サンプルの季節ごとの測定値はSteel-Dwass法を用いて有意性検定を行った。

試験期間における施設の運転条件をTable 4-3-1に示す。各期間の平均水温はそれぞれ18.6、17.6、24.9、31.2℃で、QL-1およびQL-2の平均水温は、QH-1およびQH-2の平均水温よりも有意に低かった($p < 0.05$)。流入水のBOD濃度およびCOD濃度はQH-1およびQH-2で高くなる傾向があったが、期間を通じて有意差は認められなかった。一方でTN濃度はQL-2においてQH-1およびQH-2よりも有意に高かった($p < 0.05$)。流入水のBOD/TN比は、QL-1およびQL-2ではそれぞれ1.3および1.2と低かった一方、QH-1およびQH-2では

1.7 および 2.1 と高かった。

Table 4-3-1. Influent quality parameters. Means \pm standard deviations (SD).

Sample name / Periods	Q L-1	Q L-2	Q H-1	Q H-2
Anammox granule sampling date	Jan.31	Apr.05	Jul.09	Oct.04
Water quality measurement period	Nov.1 - Jan.24	Feb.6 - Apr.4	Apr.12 - Jul.5	Jul.11 - Oct.4
Water temperature (°C)	18.6 \pm 4.5	17.6 \pm 1.8	24.9 \pm 3.1	31.2 \pm 1.7
Influent Quality				
pH	8.3 \pm 0.1	8.3 \pm 0.2	8.0 \pm 0.2	8.0 \pm 0.2
BOD (mg/L)	868 \pm 447	1019 \pm 183	1254 \pm 1,115	1141 \pm 460
COD (mg/L)	3263 \pm 1231	3623 \pm 703	4082 \pm 1649	4468 \pm 758
TN concentration (mg/L)	666 \pm 68	778 \pm 118	571 \pm 180	588 \pm 137
Org-N (mg/L)	123 \pm 62	213 \pm 88	127 \pm 73	123 \pm 78
NH ₄ -N (mg/L)	539 \pm 48	561 \pm 48	441 \pm 121	465 \pm 72
NO ₂ -N (mg/L)	0	0	0	0
NO ₃ -N (mg/L)	4 \pm 2	3 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 2
BOD/TN ratio	1.3 \pm 0.7	1.2 \pm 0.1	1.7 \pm 1.0	2.1 \pm 1.0
Inflow rate (m ³ /d)	13.8 \pm 1.4	14.0 \pm 1.4	17.1 \pm 2.5	15.9 \pm 2.7

DO 濃度には突発的な一過性の上昇も散見されたが、試験期間中の平均は 0.27 \pm 0.17mg/L で、SNAD プロセスの至適 DO 濃度とされる 0.2–0.5 mg/L の範囲内^{16) 17)}で推移した。試験期間中の MLSS 濃度および MLVSS 濃度はそれぞれ 9030–15230 mg/L および 6770–11240 mg/L と変動が大きかったが、年間を通じて有意な差はなかった。

3.1.2. グラニュールのアナモックス活性の比較

QL-1 では 1 月 31 日、QL-2 では 4 月 5 日に、第一沈殿槽に浮上したアナモックスグラニュールを 1 mm メッシュのネットで採取した。これらのサンプルをそれぞれ「L-1」、「L-2」とした。QH-1 では 7 月 9 日、および QH-2 では 10 月 4 日に、沈殿槽に浮上するグラニュールが見られなかったため、曝気槽の活性汚泥中に浮遊するグラニュールを同じメッシュネットを用いて採取した。これらのサンプルをそれぞれ「H-1」、「H-2」とした。各サンプルの写真を Fig. 4-3-1 に示す。L-1 および L-2 では鮮やかな赤色を呈していた一方、H-1 および H-2 では茶褐色を呈していた。

各グラニュールのアナモックス活性は、第 2 章と同様にトレーサーインキュベーション法^{18) 19)}により測定した。また、アナモックス菌の見かけの活性化エネルギー (E_a 値、kJ/mol) についてアナモックス活性の温度感受性に基づくアレニウスプロットを作成して計算するとともに、温度係数 (Q₁₀) を算出した。

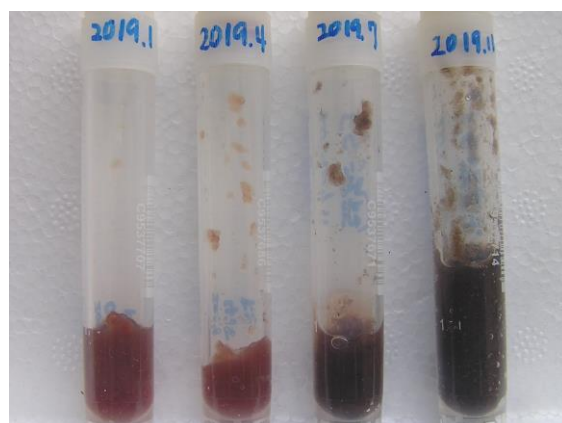


Fig. 4-3-1. Comparison of granule samples.
From left to right: L-1, L-2, H-1, H-2.

3.2. 実験結果および考察

3.2.1. 曝気槽内環境および水質の推移

曝気槽環境および処理水の水質の推移を Fig. 4-3-2 に示す。曝気槽内の水温は季節の気温とともに推移し、最高は Q H-2 で 33.4 °C、最低は Q L-1 で 12.9 °C を記録した (Fig. 4-3-2a)。流入水の COD 濃度と TN 濃度は、特に Q H-1 と Q H-2 において大雨や豚の暑熱対策として行った散水の影響を受けて変動した (Fig. 4-3-2b, 4-3-2c) が、BOD、COD、TN の除去率はそれぞれ 95–99%、92–94%、69–81% とおおむね安定しており、処理状況に有意な差は見られなかった (Fig. 4-3-2b, 4-3-2d)。OrgN 濃度は Q L-1 と Q L-2 で高い傾向にあった。Q L-1、Q L-2、Q L-3、Q L-4 の平均 TN 除去速度はそれぞれ 0.08、0.11、0.10、0.09 kg-N/m³/d とほぼ一定であり、試験期間による有意差は認められなかった。処理水の NH₄-N 濃度は流入水と比較して有意な減少が認められた (Fig. 4-3-2e)。処理水の NO₂-N 濃度は低温期の Q L-1 (55 mg/L) および Q L-2 (47 mg/L) で高く、高温期の Q H-2 (6 mg/L) よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。一方、NO₃-N 濃度は全ての試験期間において低値で推移し、処理水の NH₄-N 濃度と NO₃-N 濃度には年間を通じて有意差は認められなかった。低温期における処理水の OrgN と NO₂-N の蓄積については、低温下では従属栄養細菌による OrgN のアンモニウム化と NOB による NO₂-N の酸化が律速段階である可能性が示唆された。処理水の pH は 7.3–7.6 の範囲で、この槽の至適範囲内で推移した。

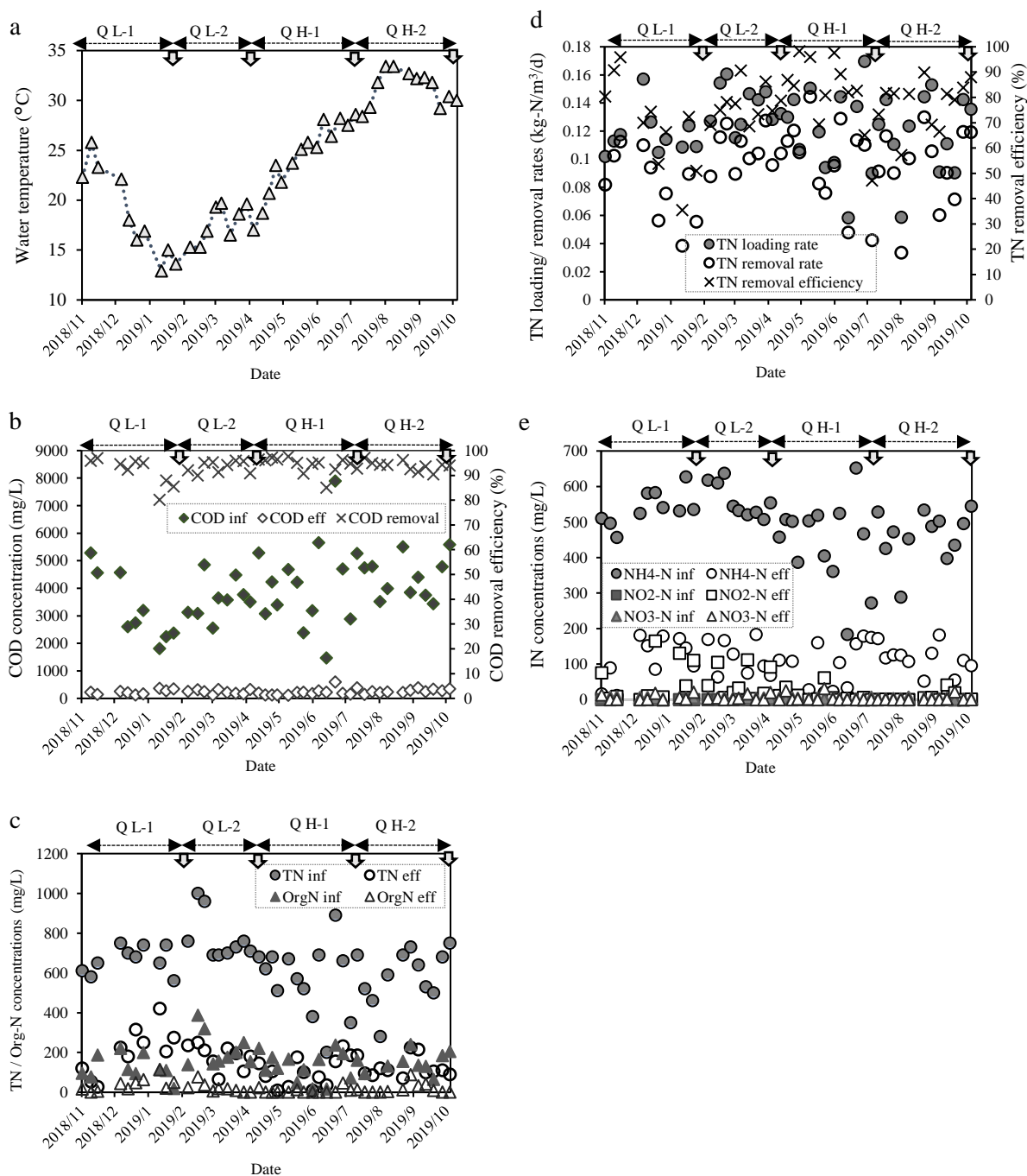


Fig. 4-3-2. Water conditions in the swine WWTP by week. (a) water temperature (b) COD (c) total nitrogen and orgN, (d) TN loading rate, removal rate, and removal efficiency and (e) inorganic nitrogen concentrations. Horizontal arrows indicate Q L-1, Q L-2, Q H-1, and Q H-2. Vertical arrows indicate the sampling date of anammox granules of each period.

3.2.2. アナモックス活性に及ぼす温度の影響

10–35 °Cにおけるグラニューールのアナモックス活性の温度感受性を Fig. 4-3-3a に示す。L-

1 および L-2 では最大活性は 30 °C で記録され、それぞれ 496 $\mu\text{mol-N}_2/\text{g-IL/h}$ および 922 $\mu\text{mol-N}_2/\text{g-IL/h}$ であった。一方、H-1 と H-2 の最大活性は 35 °C で記録され、H-1 では 476 $\mu\text{mol-N}_2/\text{g-IL/h}$ と L-1 と同程度であったが、H-2 の活性は 31 $\mu\text{mol-N}_2/\text{g-IL/h}$ と大幅に低下した。最大活性に対する各温度帯での活性の比率を Fig. 4-3-3b に示す。いずれのグラニューールも温度の低下に伴い活性は低下したが、低温期の L-1 および L-2 の活性の低下は比較的緩やかであり、10 °C における最大活性に対する比率はそれぞれ 27.0% および 33.9% と比較的高く維持されていた。一方で、高温期のグラニューールの活性は温度の低下とともに急激に下降し、10 °C における最大活性に対する比率は H-1 が 18.4%、H-2 が 7.7% と低温期より低くなった。以上のことから、平均水温が最も低い時期に存在した L-2 がすべての温度帯で最も高いアナモックス活性を示したことで、低温期に高い活性を持つことが明らかとなった。また、低温期に存在した L-1 および L-2 は水温が低下しても、高温期の H-1 および H-2 に比較して高い活性を維持していることが明らかとなった。

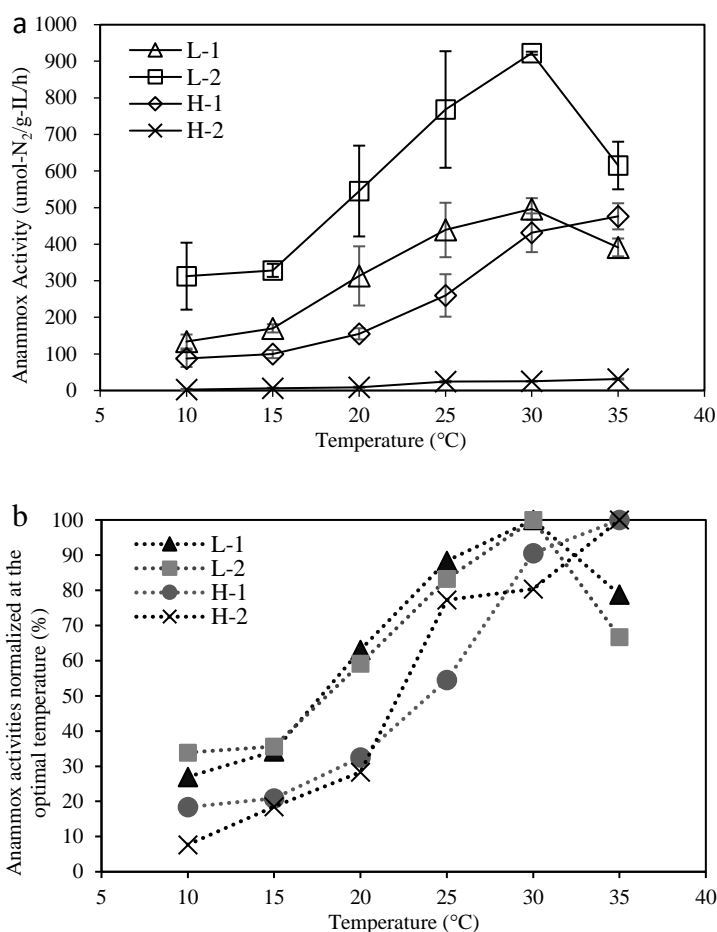


Fig. 4-3-3. (a) Temperature dependence of the anammox activity of granule samples. Bars denote standard deviation. (b) anammox activities normalized at the optimal temperature.

各温度帯における各グラニューールのアナモックス活性と脱窒活性の比較を Fig. 4-3-4 に示す。L-1、L-2、H-1 ではアナモックス活性が脱窒活性より高かったが、H-2 では脱窒活性がアナモックス活性を上回った。

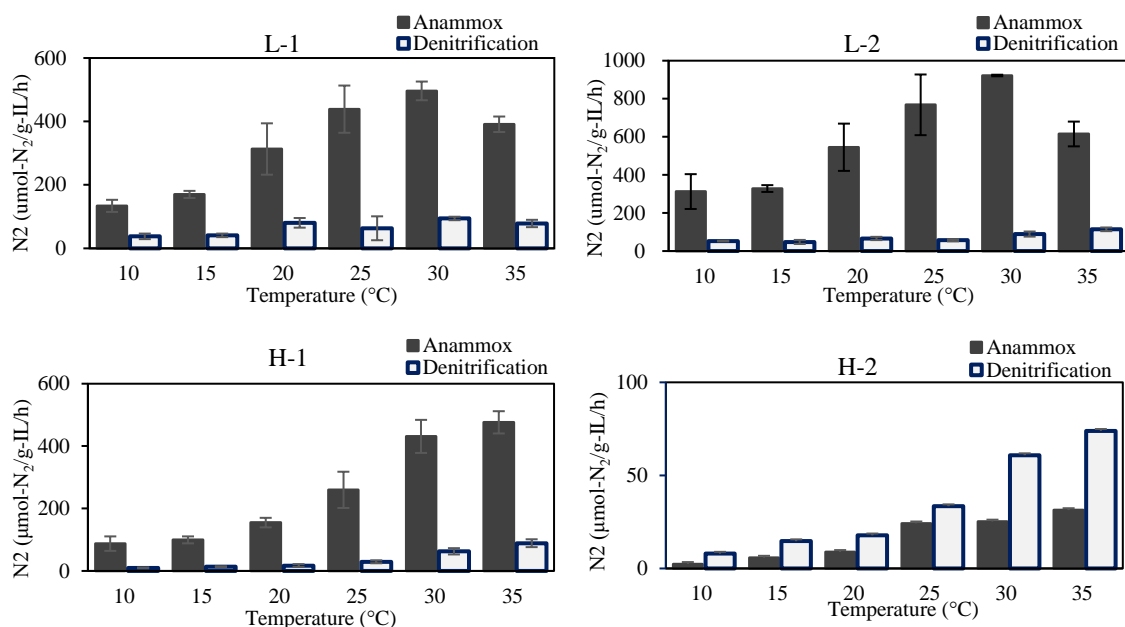


Fig. 4-3-4. Comparison of the anammox and denitrification activities of granules L-1, L-2, H-1, and H-2. Means \pm SD.

アレニウスプロットから推定したアナモックスの E_a 値を Fig. 4-3-5 に示す。グラニューール L-1、L-2、H-1、H-2 の E_a 値は、それぞれ 51.0、42.9、55.4、75.9 kJ/mol であった。また、 Q_{10} 値は、L-1 が 1.93 (10–30 °C)、L-2 が 1.72 (10–30 °C)、H-1 が 1.97 (10–35 °C)、H-2 が 2.79 (10–35 °C) であった。 E_a 値、 Q_{10} 値ともに L-2 が最も低く、L-1 と H-1 が中間でほぼ等しく、H-2 が最も高かった。

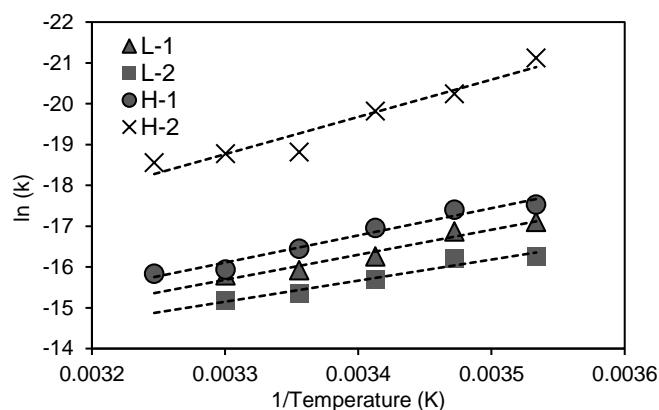


Fig. 4-3-5. Arrhenius plot of the specific anammox activity.

L-2 の Ea 値は、Isaka ら¹¹⁾ (33 kJ、28–37 °C) や Jin らの報告¹⁰⁾ (43 kJ、15–35 °C) に近い値であった。L-1 および H-1 の値は、Oshiki ら²⁰⁾ (56 kJ、4–40 °C) や Sobotka ら²¹⁾ (50.5 kJ、15–40 °C) の報告に近く、H-2 の値は、Park ら⁸⁾ (72.8 kJ、10–30 °C) および Strous ら⁷⁾ (70 kJ/mol、20–43 °C) の報告と近い値であった。UASB リアクターの試験では水温を 35 °C から 25 °C で馴養後に 15 °C に下げた場合は直接 15 °C に下げた時よりアナモックス菌グラニューールの Ea 値が低く、温度の馴養によりアナモックス菌が省エネ戦略に切り替え、低温での能力の向上を示す可能性²²⁾ が示されている。このことから、L-2 の低い Ea 値は低温への順応を示しているものと考えられた。

第4節 遺伝子学的手法による四半期別グラニューール菌叢の解析

4.1. 試験方法

各グラニューールのアナモックス菌 DNA 量は、第3章第2節の試験と同様に、リアルタイム PCR 分析により測定した。サンプルは DNA 抽出まで -20 °C で保存した。また、各グラニューールの 16S rRNA 遺伝子の次世代シーケンス解析については、ペアエンドシーケンシングまでは第2章2節で示した方式により行い、得られたペアエンドリードは DDBJ の Sequence Read Archive に登録した。アクセッション番号は以下の通りである。BioProject: PRJDB10027、BioSample: SAMD00231548–SAMD00231551。ペアエンドリードは Fastx ツールキット (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) の fastq_barcode_splitter を用いて、プライマー配列に一致する配列のみを抽出し、FLASH (ver1.2.11) を用いてリードを結合した後、QIIME2²³⁾ を用いて、プライマー配列等を除去した代表配列を得た。得られた配列は Greengenes (ver.13_8) の 97% operational taxonomic unit (OTU) と比較し系統推定を行った。その他のパラメータは標準的な条件で求めた。配列のアラインメントを行い、MEGA-X²⁴⁾ を用いて BLAST により相同性検索をかけるとともに、近隣結合法により系統樹を作成した。ブートストラップは 1000 回計算した。

4.2. 結果および考察

リアルタイム PCR 分析により測定した各グラニューールのアナモックス菌 DNA コピー数を Fig. 4-4-1 に示す。それぞれの DNA 数は 6.1×10^{10} 、 4.5×10^{11} 、 6.9×10^{10} 、 2.0×10^{10} copies/g-IL で、最も水温が低い時期に採取した L-2 において最も多くのアナモックス菌が存在することが確認された。アナモックス菌量と活性の高さは比例する²⁵⁾ とされ、L-2 は H-2 よりアナモックス菌 DNA 数が 22 倍、最大活性値が 37 倍高かったことから、L-2 の高い活性は豊富な菌量によることが示された。また、L-1 に比較して L-2 の菌量が増えていることから、低温期においてアナモックス菌の増殖が盛んに行われている可能性が示された。逆に高温期の H-1 から H-2 にかけてはアナモックス菌量が減少し、アナモックス活性より脱窒活性の高かった H-2 では脱窒菌との競合によりアナモックス菌が数を減らした可能性が考えられた。

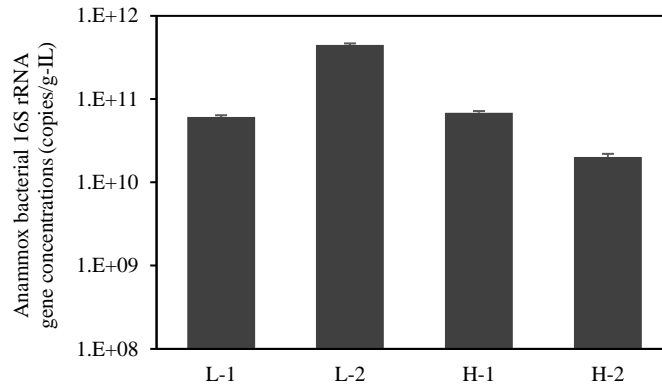


Fig. 4-4-1. Abundance of anammox bacterial 16S rRNA genes in granules L-1, L-2, H-1, and H-2 in the simultaneous nitrification, anammox, and denitrification process. Means \pm SD.

各グラニューールの次世代シーケンス解析の結果を Fig. 4-4-2 に示す。門レベルでの相対存在比 (Fig. 4-4-2a) は、Planctomycetes、Proteobacteria、Chloroflexi、Chlorobi の順で高く、Proteobacteria、Chloroflexi、Chlorobi の共存は、先行研究のアナモックス菌バイオフィルムの菌叢解析結果²⁶⁾ および第 2 章第 2 節の菌叢解析結果と一致していた。アナモックス菌が属する Planctomycetes は L-1、L-2、H-1、H-2 の全微生物群のそれぞれ 45.2%、55.2%、43.4%、22.8% を占めていた。また、従属栄養脱窒菌が属する Proteobacteria の存在比は L-1 で 22.5%、L-2 で 20.1%、H-1 で 24.7%、H-2 で 28.7% であった。アナモックス活性の高かった L-1、L-2 および H-1 では Planctomycetes の存在比が最も高かった一方で、アナモックス活性より脱窒活性が高かった H-2 では Proteobacteria の存在比が最も高く、Fig. 4-3-4 で示した各グラニューールのアナモックス活性と脱窒活性はこの菌叢の存在比に比例するものと考えられた。また、H-2 では Chloroflexi が 20%、Chlorobi が 10% と、存在比が L-1、L-2 の約 2 倍に増加した。Chloroflexi は腐敗したアナモックス菌由来の有機物を利用している²⁷⁾ とされることから、H-2 においては、アナモックス菌が従属栄養細菌との競合により数を減らしたものと考えられた。

属レベル (Fig. 4-4-2b) では、アナモックス菌に属する *Candidatus Jettenia* の存在比がすべてのグラニューールにおいて 44.3%、54.3%、42.0%、19.6% と最も高かった。*Candidatus Jettenia* の優占は、第 2 章第 2 節の結果と一致しており、この施設のアナモックス菌は長期間にわたり *Candidatus Jettenia* が優占していることが確認された。H-2 では *Candidatus Jettenia* に加え、*Candidatus Brocadia* と *Candidatus Anammoxoglobus* の 2 種類のアナモックス菌がわずかに増加していた。16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹を Fig. 4-4-3 に示す。アナモックス菌として 6 つの OTU が検出され、OTU 1、15、19、102 の 4 つの OTU が存在比 1% 以上であった。最も存在比が高い OTU 1 は、*Candidatus Jettenia asiatica* に 99% 近縁であった。OTU 15 は *Candidatus Brocadia fulgida* に 100%、OTU 18 は *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* に 100%、OTU 102 は *Candidatus Brocadia caroliniensis* に 99% 近縁であることが確認された。

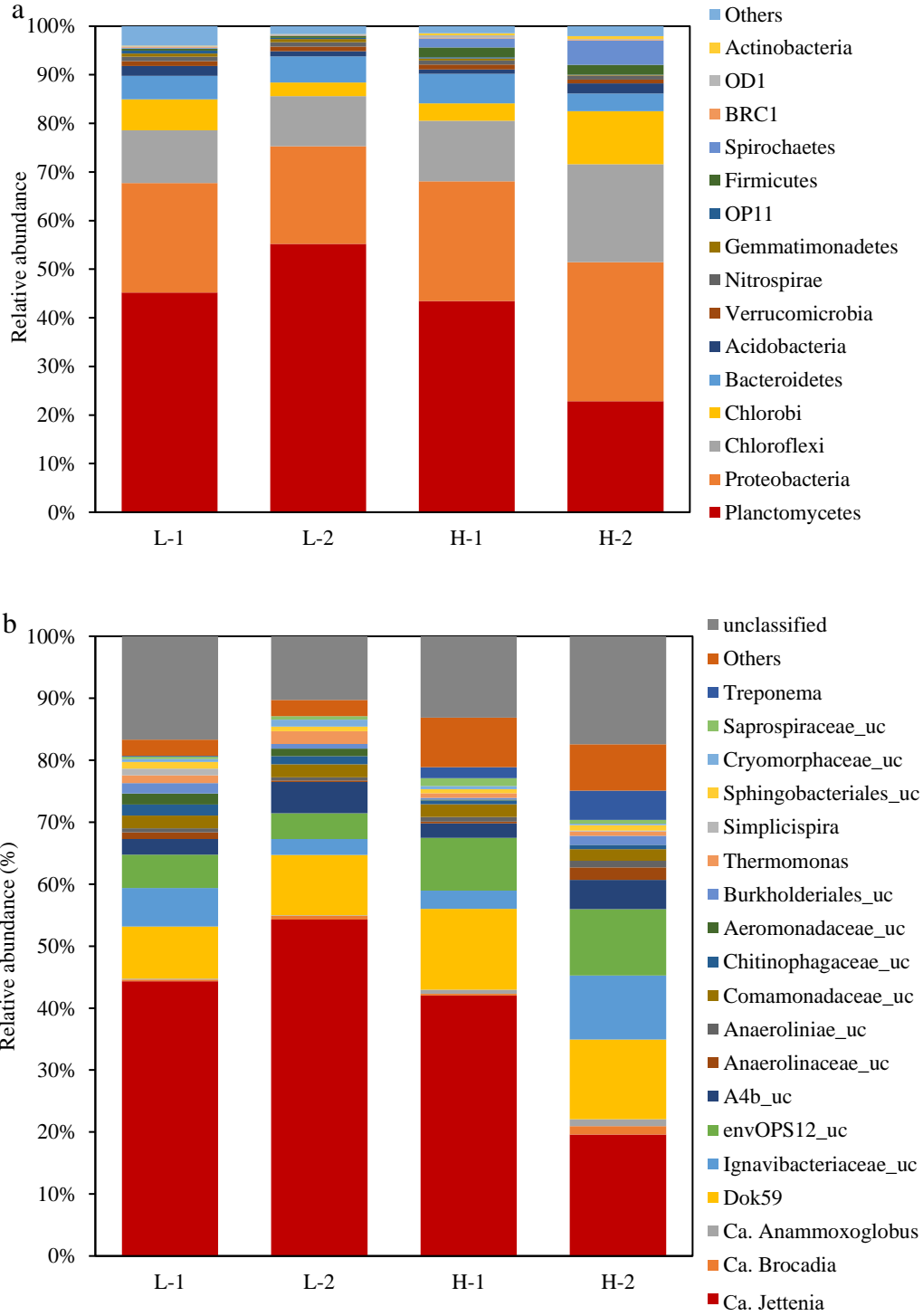


Fig. 4-4-2. Microbial community composition at the (a) phylum and (b) genus level. “Others” had a relative abundance <1%. “Ca” indicates “*Candidatus*”, “unclassified” indicates that identification has not been achieved at the genus level, and those microbes that were identified to the family level are indicated as 'uc'.

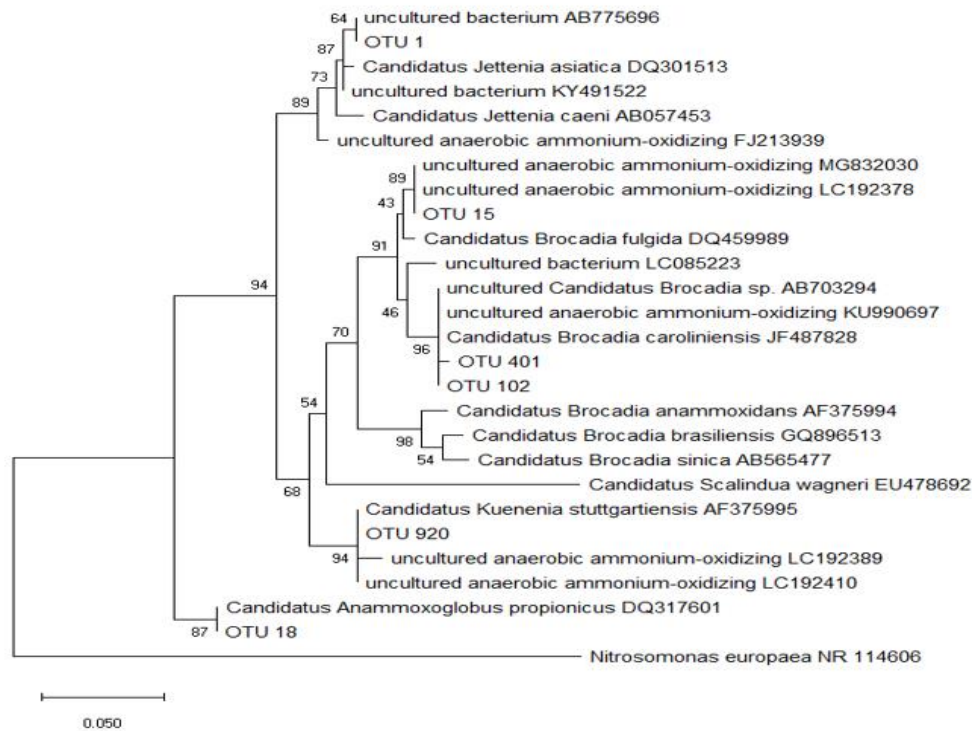


Fig. 4-4-3. Phylogenetic analysis showing the OTUs of anammox bacteria. *Nitrosomonas europaea* was used as the out group.

Proteobacteria で最も存在比が高かったのは脱窒菌として知られる Dok59²⁸⁾で、L-1 および L-2 がそれぞれ 8.4% および 8.9% であったのに対し、H-1 および H-2 ではそれぞれ 13.2% および 13.4% と増加した。また、H-2 では従属栄養細菌に属する Ignavibacteriaceae と envOPS12 も増加していた。

AOB は全サンプルに共通する 2 つの OTU を含む 4 つの OTU が未分類の Nitrosomonadaceae、それらに加えて L-1 と H-2 では 1 つの OTU が Nitrosococcus mobilis として検出された。AOB の存在比は H-2 で 0.6%、他のグラニュールでは 0.1% 以下と低かった。H-2 で AOB の存在比が上昇したのは、他のサンプルでは検出されなかった 2 種類の Nitrosomonadaceae が増加したことによると考えられた。グラニュール中の AOB の存在比は小さかったが、これは 2 mm 以上の大粒のグラニュール中には AOB の割合が 0.1% 以下であるとする報告²⁹⁾と一致した。Tao らは、酸素の制限により大きなグラニュールより 0.1 mm 未満の小さなグラニュール状の汚泥で AOB と NOB が多く検出される²⁹⁾としている。また、グラニュールの大きさ と物質透過性は反比例する³⁰⁾とされることから、粒径の大きなグラニュールでは酸素の供給が制限され、AOB が増殖できなかったものと考えられた。一方、NOB においては、すべてのグラニュールにおいて門レベルでは Nitrospirae と同定されたものが属レベルでは硫酸塩還元菌に属する Thermodesulfobionaceae と同定されたことから、今回の分析では NOB に相当する菌は検出されなかった。SNAD プロセスにおいては、NO₂-N の利用におい

てアナモックス菌と競合関係にある NOB を抑制することが重要である^{17) 31) 32)}ことから、NOB が検出されなかったことは SNAD プロセスにおける適切な運転管理が行われていることを示していると考えられた。

アナモックス菌の存在比が低下し、従属栄養細菌の存在比が高かった H-2 における菌叢の変化は、流入水の BOD/TN 比の上昇に伴いアナモックス菌量が減少し、AOB 活性の増加および NO₂-N を経由したショートカット硝化脱窒の増加がみられたとする報告²⁵⁾とおおむね一致していた。BOD/TN 比は Q L-1 および Q L-2 よりも Q H-2 の方が高かったことから、有機物の増加は従属栄養細菌との競合においてアナモックス菌に不利な条件であったことが示された。

今回の試験では、水温が変動しても優占するアナモックス菌の菌種に変動がなく、グラニューール中には年間を通して *Candidatus Jettenia asiatica* が優占することが確認された。*Candidatus Jettenia asiatica* は 20°C の低温条件下での培養での優占例が報告されており³³⁾、また低温に適応するために遺伝子の転写や翻訳を変化させることができる³⁴⁾とされる。これらのことから、優占菌種である *Candidatus Jettenia asiatica* が季節の水温変動に伴い低温への適応を示したものと判断された。一方、顆粒 H-2 で占有率がわずかに増加した他の 2 種は高温条件下で増殖したものであり、低温への順応を獲得していない可能性が示唆された。

以上のことから、L-2 の高いアナモックス活性は、豊富な基質の存在下で蓄積されたアナモックス菌量の多さと、優占種である *Candidatus Jettenia asiatica* が低温に順応したことによるものと考えられ、この活性の高いグラニューールが低温期における窒素除去に寄与しているものと考えられた。すなわち、調査期間中における安定した窒素除去速度は、季節の水温や流入水質の変動に伴い、低温期はアナモックス反応が優位となり、高温期は従属栄養脱窒が優位となる SNAD プロセスによって成立しているものと判断された。

SNAD プロセスにおいて優占種となるアナモックス菌には、*Candidatus Kuenenia*³⁵⁾³⁶⁾、*Candidatus Brocadia*^{37) 38)}の報告があるが、本試験においてそれらの存在比は低かった。*Candidatus Jettenia asiatica* は、低濃度の酢酸とプロピオン酸を炭素源として利用する³⁹⁾ことが知られており、酢酸とプロピオン酸の添加でアナモックスグラニューールの最優占種が *Candidatus Kuenenia* から *Candidatus Jettenia* に置き換わった報告⁴⁰⁾がある。また、*Candidatus Jettenia* はフルボ酸を含む廃水のアナモックスプロセスに向いているとする報告⁴¹⁾もある。これらのことから、*Candidatus Jettenia* は高濃度に有機物を含む畜産廃水において優位な条件にあった可能性が考えられた。

第 5 節 結言

本章では、加温を行わない FS 槽において冬～春季に浮上するグラニューールが低温下においても高いアナモックス活性を持つ可能性に着目し、アナモックス菌の低温への順応の可能性および窒素除去に与える影響について検討を行い、以下の知見を得た。

1. 低温期に浮上するアナモックス菌グラニューールはアナモックス反応の基質である NH₄-N と NO₂-N の豊富な存在下で、アナモックス反応により発生した窒素ガスにより浮上すると考えられた。

2. 四半期別に採取したグラニューールにおいて、最も水温の低い時期に採取されたグラニューールで最大のアナモックス活性とアナモックス菌 DNA 量が記録された。このことから、低温下において豊富な基質の存在下でアナモックス菌が増殖し、菌が高濃度に集積されたグラニューールが高い活性をもつことを明らかにした。
3. 低温期に採取したグラニューールでは、最大活性が 30°C で記録され、また、水温が低下しても活性の低下が緩やかであった。一方、高温期に採取したグラニューールでは最大活性は 35°C で記録され、水温低下とともに活性は低温期グラニューールより大きく低下した。このことから、グラニューールのアナモックス菌が低温に順化したことが示された。グラニューールのアナモックス菌は、年間を通して *Candidatus Jettenia asiatica* が最優占種であったことから、*Candidatus Jettenia asiatica* が水温の変動に対応し、低温への耐性を獲得したものと判断された。
4. グラニューールには SNAD プロセスを構成するアナモックス菌、従属栄養脱窒菌および AOB が共存していることを確認した。NOB の生育は抑制されていたことから、SNAD プロセスにおける適切な運転が行われていることが確認された。
5. 季節の水温や流入水質の変動に伴い、低温期はアナモックス反応が優位となり、高温期は従属栄養脱窒が優位となることで、年間を通して安定した窒素除去が行われているものと判断された。

第 4 章参考文献

- 1) Daverey, A., Hung, N.-T., Dutta, K., Lin, J.-G.: Ambient temperature SNAD process treating anaerobic digester liquor of swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 141, 191–198 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.045>.
- 2) Wang, Y., Gong, B., Lin, Z., Wang, J., Zhang, J., Zhou, J.: Robustness and microbial consortia succession of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process for mature landfill leachate treatment under low temperature. *Biochem. Eng. J.* 132, 112–121 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.01.009>.
- 3) Chen, H., Ma, C., Yang, G.-F., Wang, H.-Z., Yu, Z.-M., Jin, R.-C.: Floatation of flocculent and granular sludge in a high-loaded anammox reactor. *Bioresour. Technol.* 169, 409–415 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.063>.
- 4) Lu, H., Ji, Q., Ding, S., Zheng, P.: The morphological and settling properties of ANAMMOX granular sludge in high-rate reactors. *Bioresour. Technol.* 143, 592–597 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.046>.
- 5) Dosta, J., Fernández, I., Vázquez-Padín, J.R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Mata-Álvarez, J., Méndez, R.: Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *J. Hazard. Mater.* 154, 688–693 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.082>.
- 6) Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., van der Meer, J.R., Zehnder, A.J.B.: Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* 175, 198–207 (2001). <https://doi.org/10.1007/s002030100255>.
- 7) Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M.: Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3248–3250 (1999). <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.3248-3250.1999>.
- 8) Park, G., Takekawa, M., Soda, S., Ike, M., Furukawa, K.: Temperature dependence of nitrogen removal activity by anammox bacteria enriched at low temperatures. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 505–511 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.11.009>.
- 9) Hu, Z., Lotti, T., de Kreuk, M., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M., Kruit, J., Jetten, M.S.M., Kartal, B.: Nitrogen Removal by a Nitrification-Anammox Bioreactor at Low Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2807–2812 (2013). <https://doi.org/10.1128/AEM.03987-12>.
- 10) Jin, R.-C., Ma, C., Yu, J.-J.: Performance of an Anammox UASB reactor at high load and low ambient temperature. *Chem. Eng. J.* 232, 17–25 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.07.059>.
- 11) Isaka, K., Date, Y., Kimura, Y., Sumino, T., Tsuneda, S.: Nitrogen removal performance using anaerobic ammonium oxidation at low temperatures. *FEMS Microbiol. Lett.* 282, 32–38 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01095.x>.
- 12) Agrawal, S., Karst, S.M., Gilbert, E.M., Horn, H., Nielsen, P.H., Lackner, S.: The role of inoculum and reactor configuration for microbial community composition and dynamics in mainstream partial nitrification anammox reactors. *MicrobiologyOpen.* 6, e00456 (2017).

<https://doi.org/10.1002/mbo3.456>.

- 13) Xu, S., Lu, W., Mustafa, M.F., Caicedo, L.M., Guo, H., Fu, X., Wang, H.: Co-existence of Anaerobic Ammonium Oxidation Bacteria and Denitrifying Anaerobic Methane Oxidation Bacteria in Sewage Sludge: Community Diversity and Seasonal Dynamics. *Microb. Ecol.* 74, 832–840 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1015-x>.
- 14) Laurenzi, M., Weissbrodt, D.G., Szivák, I., Robin, O., Nielsen, J.L., Morgenroth, E., Joss, A.: Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal wastewater. *Water Res.* 80, 325–336 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.026>.
- 15) Taotao, Z., Dong, L., Huiping, Z., Shuibo, X., Wenxin, Q., Yingjiu, L., Jie, Z.: Nitrogen removal efficiency and microbial community analysis of ANAMMOX biofilter at ambient temperature. *Water Sci. Technol.* 71, 725–733 (2015). <https://doi.org/10.2166/wst.2015.019>.
- 16) Daverey, A., Chen, Y.-C., Dutta, K., Huang, Y.-T., Lin, J.-G.: Start-up of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in sequencing batch biofilm reactor using novel biomass carriers. *Bioresour. Technol.* 190, 480–486 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.064>.
- 17) Liu, T., Ma, B., Chen, X., Ni, B.-J., Peng, Y., Guo, J.: Evaluation of mainstream nitrogen removal by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a granule-based reactor. *Chem. Eng. J.* 327, 973–981 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.173>.
- 18) Waki, M., Yasuda, T., Suzuki, K., Sakai, T., Suzuki, N., Suzuki, R., Matsuba, K., Yokoyama, H., Ogino, A., Tanaka, Y.: Rate determination and distribution of anammox activity in activated sludge treating swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 2685–2690 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.081>.
- 19) Yoshinaga, I., Amano, T., Yamagishi, T., Okada, K., Ueda, S., Sako, Y., Suwa, Y.: Distribution and Diversity of Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) Bacteria in the Sediment of a Eutrophic Freshwater Lake, Lake Kitaura, Japan. *Microbes Environ.* 26, 189–197 (2011). <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10184>.
- 20) Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H., Okabe, S.: Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium ‘*Candidatus Brocadia sinica*.’ *Microbiology.* 157, 1706–1713 (2011). <https://doi.org/10.1099/mic.0.048595-0>.
- 21) Sobotka, D., Czerwionka, K., Makinia, J.: Influence of temperature on the activity of anammox granular biomass. *Water Sci. Technol.* 73, 2518–2525 (2016). <https://doi.org/10.2166/wst.2016.103>.
- 22) Cheng, Y.-F., Zhang, Z.-Z., Li, G.-F., Zhang, Q., Zheng, X.-P., Cai, S., Xue, Y., Huang, B.-C., Jin, R.-C.: Anammox Granules Acclimatized to Mainstream Conditions Can Achieve a Volumetric Nitrogen Removal Rate Comparable to Sidestream Systems. *Environ. Sci. Technol.* 54, 12959–12966 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01469>.
- 23) Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod,

- A., Brislaw, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvall, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Lofffield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G.: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- 24) Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Niyaz, C., Tamura, K.: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549 (2018). <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
 - 25) Jenni, S., Vlaeminck, S.E., Morgenroth, E., Udert, K.M.: Successful application of nitrification/anammox to wastewater with elevated organic carbon to ammonia ratios. *Water Res.* 49, 316–326 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.073>.
 - 26) Pereira, A.D., Cabezas, A., Etchebehere, C., Chernicharo, C.A. de L., de Araújo, J.C.: Microbial communities in anammox reactors: a review. *Environ. Technol. Rev.* 6, 74–93 (2017). <https://doi.org/10.1080/21622515.2017.1304457>.
 - 27) Kindaichi, T., Yuri, S., Ozaki, N., Ohashi, A.: Ecophysiological role and function of uncultured *Chloroflexi* in an anammox reactor. *Water Sci. Technol.* 66, 2556–2561 (2012). <https://doi.org/10.2166/wst.2012.479>.
 - 28) Gonzalez-Silva, B.M., Rønning, A.J., Andreassen, I.K., Bakke, I., Cervantes, F.J., Østgaard, K., Vadstein, O.: Changes in the microbial community of an anammox consortium during adaptation to marine conditions revealed by 454 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 5149–5162 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8160-5>.
 - 29) Tao, J., Xing, J., Wang, D., Sheng, B., Meng, F.: Deciphering the genesis of anammox granular sludge floating from the perspective of microbial community. *J. Water Process Eng.* 36, 101265 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101265>.
 - 30) Xu, D., Fan, J., Li, W., Chen, W., Pan, C., Kang, D., Li, Y., Shan, S., Zheng, P.: Deciphering correlation between permeability and size of anammox granule: “pores as medium.” *Water Res.* 191, 116832 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116832>.

- 31) Li, J., Li, J., Gao, R., Wang, M., Yang, L., Wang, X., Zhang, L., Peng, Y.: A critical review of one-stage anammox processes for treating industrial wastewater: Optimization strategies based on key functional microorganisms. *Bioresour. Technol.* 265, 498–505 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.013>.
- 32) Zhang, F., Peng, Y., Miao, L., Wang, Z., Wang, S., Li, B.: A novel simultaneous partial nitrification Anammox and denitrification (SNAD) with intermittent aeration for cost-effective nitrogen removal from mature landfill leachate. *Chem. Eng. J.* 313, 619–628 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.105>.
- 33) Hu, B., Rush, D., van der Biezen, E., Zheng, P., van Mullekom, M., Schouten, S., Sinnighe Damsté, J.S., Smolders, A.J.P., Jetten, M.S.M., Kartal, B.: New Anaerobic, Ammonium-Oxidizing Community Enriched from Peat Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 966–971 (2011). <https://doi.org/10.1128/AEM.02402-10>.
- 34) Lin, X., Wang, Y., Ma, X., Yan, Y., Wu, M., Bond, P.L., Guo, J.: Evidence of differential adaptation to decreased temperature by anammox bacteria: The proteome response of anammox bacteria to low temperature. *Environ. Microbiol.* 20, 3514–3528 (2018). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14306>.
- 35) Wang, C., Liu, S., Xu, X., Zhang, C., Wang, D., Yang, F.: Achieving mainstream nitrogen removal through simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification process in an integrated fixed film activated sludge reactor. *Chemosphere.* 203, 457–466 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.016>.
- 36) Zheng, Z., Huang, S., Bian, W., Liang, D., Wang, X., Zhang, K., Ma, X., Li, J.: Enhanced nitrogen removal of the simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) biofilm reactor for treating mainstream wastewater under low dissolved oxygen (DO) concentration. *Bioresour. Technol.* 283, 213–220 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.148>.
- 37) Liang, Y., Li, D., Zhang, X., Zeng, H., Yang, Z., Zhang, J.: Microbial characteristics and nitrogen removal of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process treating low C/N ratio sewage. *Bioresour. Technol.* 169, 103–109 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.064>.
- 38) Wen, X., Gong, B., Zhou, J., He, Q., Qing, X.: Efficient simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) system equipped with a real-time dissolved oxygen (DO) intelligent control system and microbial community shifts of different substrate concentrations. *Water Res.* 119, 201–211 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.052>.
- 39) Huang, X.-L., Gao, D.-W., Tao, Y., Wang, X.-L.: C2/C3 fatty acid stress on anammox consortia dominated by *Candidatus Jettenia asiatica*. *Chem. Eng. J.* 253, 402–407 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.055>.
- 40) Liang, Y., Li, D., Zhang, X., Zeng, H., Yang, Y., Zhang, J.: Nitrate removal by organotrophic anaerobic ammonium oxidizing bacteria with C2/C3 fatty acid in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Bioresour. Technol.* 193, 408–414 (2015).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.133>.

- 41) Zhang, L., Wang, Y., Soda, S., He, X., Hao, S., You, Y., Peng, Y.: Effect of fulvic acid on bioreactor performance and on microbial populations within the anammox process. *Bioresour. Technol.* 318, 124094 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124094>.

第5章 曝気制御による窒素除去の安定化に関する実証試験

第1節 緒言

第4章で示したとおり、調査対象とした養豚廃水処理施設では窒素除去速度は年間を通して一定であったが、第2章第3節でも示したように、冬季の流入水の窒素濃度は高く、NO₂-Nの蓄積などにより処理水の窒素濃度が上昇する傾向が認められた。冬季のNO₂-Nの蓄積は低温期におけるアナモックス菌の集積に寄与する可能性が示された一方で、過剰なNO₂-Nの蓄積はpHを低下させ、FNAの上昇等によるアナモックス菌への阻害¹⁾により窒素除去能が低下することを第2章第4節で確認している。アナモックスのSBRにおける試験では、水温15℃以下でNO₂-Nが蓄積し、窒素除去能が低下した事例が報告されており²⁾³⁾、窒素除去の安定にはNO₂-Nのコントロールが必要であることが示されている。また、NO₂-N濃度の上昇はアナモックス菌バイオフィームからのグラニューールの浮上⁴⁾⁶⁾を誘発し、アナモックス菌バイオマスの流出によりプロセスを不安定にさせる要因となる⁴⁾。さらに、NO₂-Nの蓄積は温室効果ガスである一酸化二窒素(N₂O)の生成量を増加させる要因⁷⁾ともなりうる。従って、これらのマイナス要因を回避するためには過剰なNO₂-Nの蓄積を抑制する必要がある。冬季にNO₂-Nが蓄積する要因としては、水温低下によりアナモックス菌よりAOBの活性が高くなり⁸⁾、NH₄-Nの過剰な酸化がおこることによるもの⁹⁾とされ、この対策として曝気量を抑制し、DO濃度を適切に調整することが必要とされている⁸⁾⁹⁾。そこで、曝気槽のDO濃度を指標とした曝気量制御を行い、過剰な硝化を抑制することによる窒素除去能の安定化を試みた。また、曝気量を抑制することで消費電力量が減少し、処理にかかるランニングコストが削減できる可能性が考えられたことから、曝気制御による消費電力量の削減効果を検証した。

第2節 曝気制御による低温期の窒素除去能の安定化試験

2.1. 試験方法

2020年1月に、曝気槽の突発的なDO濃度の上昇を抑え、DO濃度がこの施設のSNADプロセスの至適範囲である0.3 mg/L以下に自動で維持されるように曝気制御システムを構築した。Fig. 5-1に制御システムの概要を示す。第3章の曝気制御システムと同様に、曝気槽に蛍光式溶存酸素センサー(LDO2、Hach Co.)を設置し、接続した変換器(sc200、Hach Co.)について逆フェーズのP制御により測定したDO濃度に反比例した値を伝送出力するよう設定した。曝気量は変換器の出力を受け、インバーター制御によりDO濃度上昇時にはルーツプロアの出力を下げ曝気量を抑制し、下降時には出力を上げて曝気量を増やすように設定した。センサーにはパルスエアジェット洗浄器を取り付け、センサーへのバイオフィーム付着による感度低下を防止した。

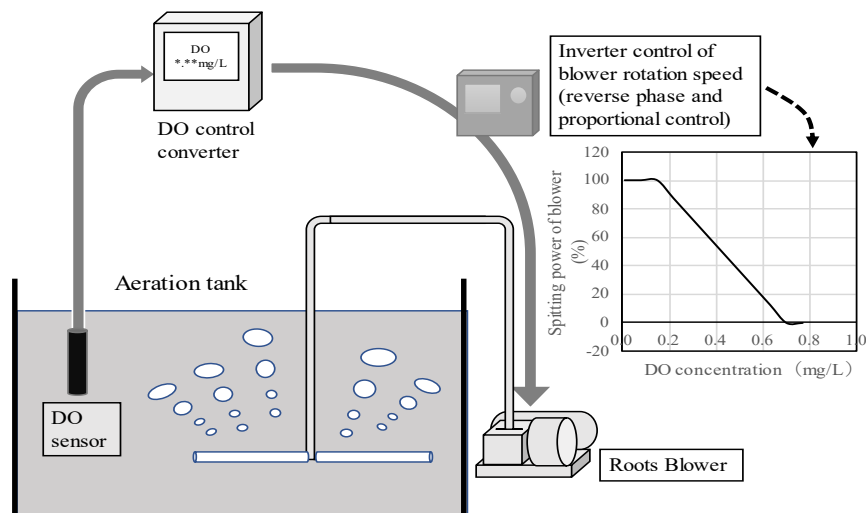


Fig. 5-1. Schematic diagram of the aeration control system.

槽内環境および水質については、第2章と同様の方法で水温、DO濃度、pH、TN濃度およびIN濃度については週1回、BODについては月1回の測定を行った。電気使用量は曝気槽の制御盤に設置された積算電力計により測定した。曝気制御導入後の試験区を2020年11月–2021年3月、曝気制御を行う前の対照区については、試験区と異なる定格出力の汚水移送ポンプが接続されていた2018–2019年を除外し、BOD容積負荷がほぼ同等であった2017年11月–2018年3月とした。試験区と対照区の数値の比較はWilcoxon順位検定で行った。試験区および対照区の流入水の水質および運転条件をTable 5-1に示す。水温は試験区では15.3–22.4 °C、対照区では10.1–22.7 °Cの間で推移し、平均値は対照区が有意に低かった ($P < 0.01$)。これは試験区の気温 9.9 ± 4.8 °Cに対し、対照区が 7.0 ± 5.2 °Cと有意に低かった ($P < 0.01$) ことが影響したと考えられた。流入水量は対照区が有意に多かった ($P < 0.05$)。その他の項目に有意差は認められなかった。

Table 5-1. Influent quality and operating conditions in the aeration tank. Average \pm SD.

	Unit	Test section	Control
Water temperature	°C	19.0 ± 2.3	16.3 ± 3.8
BOD	mg/L	1343 ± 319	1279 ± 758
TN	mg/L	731 ± 134	696 ± 255
TIN	mg/L	572 ± 88	513 ± 128
BOD volumetric load	Kg-BOD/m ³ /d	0.32 ± 0.09	0.34 ± 0.15
TN volumetric load	Kg-N/m ³ /d	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.04
BOD/MLSS	kg/kg/d	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Inflow rate	m ³ /d	12.3 ± 1.9	14.2 ± 3.2

曝気槽内のMLSSおよびMLVSSはそれぞれ試験区で 10536 ± 962 および 8223 ± 636 mg/L、対照区で 10813 ± 872 および 8998 ± 594 mg/Lで、いずれも有意差は認められなかった。

なお、試験区においては、月1回、曝気槽壁面に付着するアナモックス菌バイオフィルムを採取し、第3章第2節に示した方法でリアルタイムPCR分析により菌数を測定した。

2.2. 結果および考察

水質等の測定結果をFig.5-2に示す。DO濃度の平均値は試験区が 0.26 ± 0.03 mg/Lと設定した至適範囲内で安定していたのに対し、対照区は 0.30 ± 0.38 mg/Lと変動幅が大きく、0.5 mg/L以上まで上昇する日も認められた (Fig. 5-2a)。pHの平均値は試験区が 7.6 ± 0.3 と至適範囲内での変動であったのに対し、対照区は 7.3 ± 0.5 と試験区よりやや低く、至適範囲を逸脱するpHの下降が認められた。平均IN濃度は、試験区ではNH₄-Nが 99 ± 62 mg/L、NO₂-Nが 11 ± 13 mg/L、NO₃-Nが 5 ± 8 mg/Lであったのに対し、対照区ではそれぞれ 108 ± 74 mg/L、 48 ± 54 mg/L、 10 ± 14 mg/Lであり、期間中のNO₂-N濃度は対照区が有意に高かった ($P < 0.05$, Fig. 5-2b)。対照区においては、DO濃度の上昇に一致してNO₂-N濃度の上昇が認められたのに対し、試験区ではNO₂-N濃度の大幅な上昇は認められなかった。アナモックス反応の阻害要因とされるFNA濃度は試験区では低値で推移したが、NH₄-N濃度の上昇に一致してFA濃度が一過性に上昇し、16 mg/Lに上昇したときにはIN除去速度の低下が認められた (Fig. 5-2c, 5-2d)。これは、曝気量の不足によりNH₄-Nの硝化が抑制されて基質が律速になるとともに、FAによるアナモックス反応の阻害がおきたものと考えられた。このことから、適切な曝気量の管理には酸素供給量の不足への対応策も必要となると考えられた。それ以外では窒素除去速度はおおむね安定していた。一方、対照区ではpHの下降に一致したFNA濃度の0.5mg/L以上への上昇が3回認められ、それに一致してIN除去速度が急激に低下した。これはFNAによるアナモックス反応の阻害があったものと考えられた。IN除去速度は試験区が 0.11 ± 0.02 kg-N/m³/dで、FA濃度が上昇したときの一過性の低下を除いてはおおむね0.1 kg-N/m³/d以上で推移したのに対し、対照区は 0.10 ± 0.03 kg-N/m³/dで試験区より変動が大きかった (Fig. 5-2d)。全窒素除去率は試験区が $82 \pm 11\%$ と良好であったのに対し、対照区は $69 \pm 18\%$ と有意に低く ($P < 0.05$)、変動も試験区より大きかった。処理水における水質汚濁防止法で規定される硝酸性窒素等の換算窒素濃度 (計算式 $\text{NH}_4\text{-N} \times 0.4 + \text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$) は、試験区ではすべての測定回で一般基準値である100 mg/Lを下回った一方、対照区では26回中11回で一般基準値を上回った (Fig. 5-2e)。なお、処理水のBOD除去率および除去速度はそれぞれ試験区で $97 \pm 1\%$ および 0.32 ± 0.09 kg-BOD/m³/d、対照区で $95 \pm 4\%$ および 0.32 ± 0.15 kg-BOD/m³/dであり、有機物は良好に処理されていた。

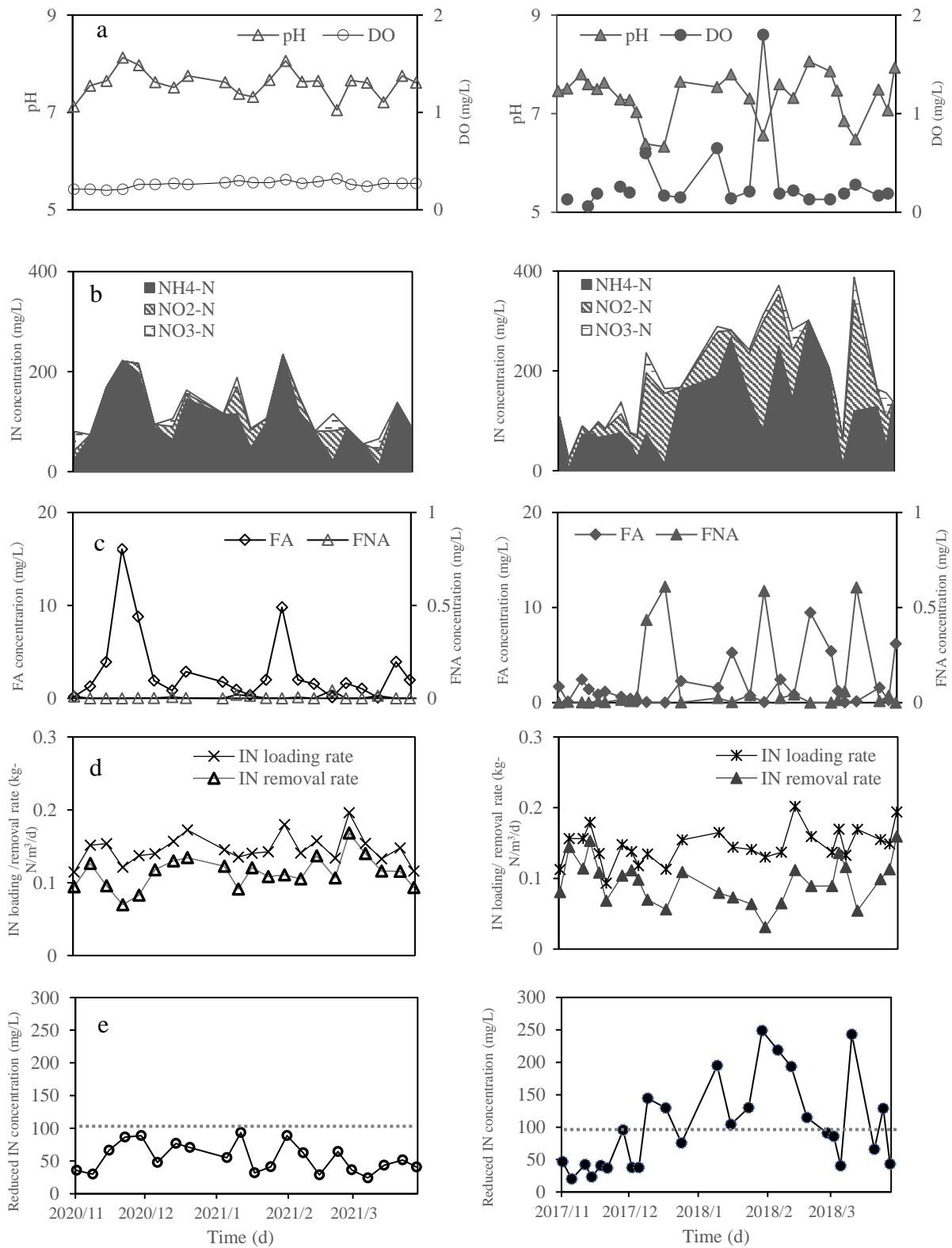


Fig. 5- 2. Changes in water quality in the aeration tank. Left: test section, right: control. (a) pH and DO (b) IN concentration (c) FA and FNA concentration (d) IN loading and removal rates (e) reduced IN concentrations in effluent. The dotted line indicates the general standard of 100 mg/L.

試験期間中の試験区における壁面付着バイオフィルムのアナモックス菌 DNA 量の推移を Fig. 5-3 に示す。アナモックス菌量は 8.1×10^{10} – 9.3×10^{11} copies-g/IL と高濃度で維持された。NO₂-N の蓄積はなかったが、1–3 月に菌量が増加する傾向が認められた。このことから、グラニューールと同様に壁面バイオフィルムにおいても低温期にアナモックス菌が増殖していることが示され、この特徴は低温に順応したことによるものと考えられた。また、曝気制御はアナモックス菌の生育には負の影響は与えなかったと判断された。また、試験区においては、試験期間中にグラニューールの顕著な浮上は観察されず、NO₂-N の蓄積がおこらなかったことでグラニューールの浮上が抑制されたものと考えられた。

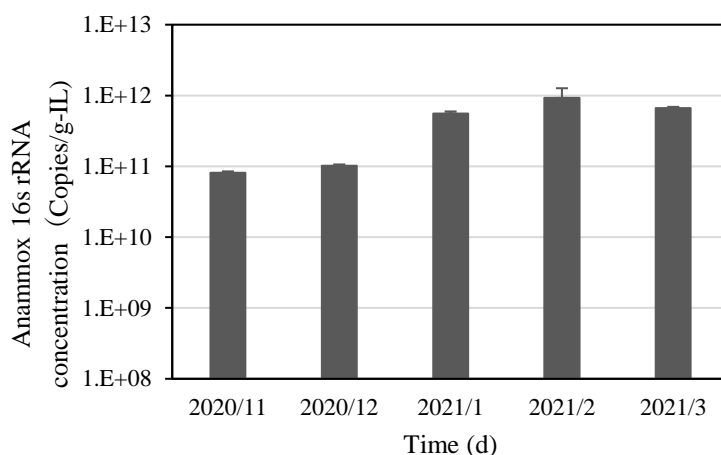


Fig. 5-3. Changes of anammox bacteria DNA copy numbers in biofilm attached on the wall in the test section with aeration control.

廃水処理にかかる 1 日あたりの消費電力量の比較を Fig. 5-4 に示す。1 日あたりの消費電力量および流入水量あたりの消費電力量は、試験区がそれぞれ 93.6 kWh および 8.3 kWh/m³ であったのに対し、対照区では 128.8 kWh および 9.6 kWh/m³ であり、いずれも試験区が有意に低く ($p < 0.01$)、それぞれ 27%、14% の削減が達成された。試験区の試験期間における電力料金単価 (17.2 円/kWh) により計算した単位処理水量 1 m³ あたりの電力料金は、試験区が 142.3 円に対し対照区が 165.8 円となり、試験区の電力料金も有意 ($p < 0.01$) に低減された。

以上のことから、曝気槽内の DO 濃度に応じて曝気量を制御するシステムの導入により、NO₂-N の蓄積が抑制されて低温期において安定した良好な窒素除去が行なわれるとともに、消費電力量の削減による処理コストの低減が可能となることが明らかとなった。

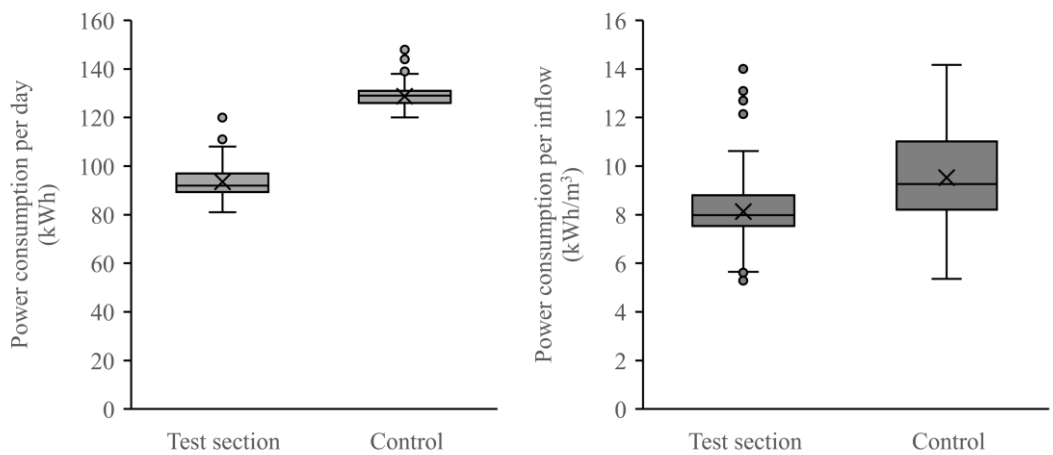


Fig. 5-4. Comparison of energy consumption. (a) power consumption per day (b) power consumption per inflow by day.

第3節 結言

フルスケールの養豚廃水処理施設の曝気槽に曝気制御システムを導入し、冬季の窒素除去能の安定化と消費電力削減効果を検証する試験を行い、以下の知見を得た。

1. 曝気量の制御により冬季の $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積が抑制され、窒素除去速度が安定した。その結果、試験期間を通して水質汚濁防止法で規定される「硝酸性窒素等」の換算窒素濃度を一律基準以下に保つことができた。一方で、曝気不足の影響によると考えられる $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度および FA 濃度の上昇による窒素除去速度の低下もみられたことから、適正な曝気のコントロールの方法についてはさらなる検討が必要である。
2. 曝気制御により、廃水処理にかかる消費電力量が有意に減少し、ランニングコストの低減が可能となることが明らかとなった。

第 5 章参考文献

- 1) Jin, R.-C., Yang, G.-F., Yu, J.-J., Zheng, P.: The inhibition of the Anammox process: A review. *Chem. Eng. J.* 197, 67–79 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.014>.
- 2) Dosta, J., Fernández, I., Vázquez-Padín, J.R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Mata-Álvarez, J., Méndez, R.: Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *J. Hazard. Mater.* 154, 688–693 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.082>.
- 3) Sobotka, D., Czerwionka, K., Makinia, J.: Influence of temperature on the activity of anammox granular biomass. *Water Sci. Technol.* 73, 2518–2525 (2016). <https://doi.org/10.2166/wst.2016.103>.
- 4) Chen, J., Ji, Q., Zheng, P., Chen, T., Wang, C., Mahmood, Q.: Flootation and control of granular sludge in a high-rate anammox reactor. *Water Res.* 44, 3321–3328 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.016>.
- 5) Lu, H., Zheng, P., Ji, Q., Zhang, H., Ji, J., Wang, L., Ding, S., Chen, T., Zhang, J., Tang, C., Chen, J.: The structure, density and settlability of anammox granular sludge in high-rate reactors. *Bioresour. Technol.* 123, 312–317 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.003>.
- 6) Tan, H., Wang, Y., Tang, X., Li, L., Feng, F., Mahmood, Q., Wu, D., Tang, C.-J.: Quantitative determination of cavitation formation and sludge flotation in Anammox granules by using a new diffusion-reaction integrated mathematical model. *Water Res.* 174, 115632 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115632>.
- 7) Okabe, S., Oshiki, M., Takahashi, Y., Satoh, H.: N₂O emission from a partial nitrification–anammox process and identification of a key biological process of N₂O emission from anammox granules. *Water Res.* 45, 6461–6470 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.040>.
- 8) Lotti, T., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M.: Effect of temperature change on anammox activity: Temperature Effect on Anammox Bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 98–103 (2015). <https://doi.org/10.1002/bit.25333>.
- 9) Lackner, S., Gilbert, E.M., Vlaeminck, S.E., Joss, A., Horn, H., van Loosdrecht, M.C.M.: Full-scale partial nitritation/anammox experiences – An application survey. *Water Res.* 55, 292–303 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.032>.

第6章 結論および今後の展望

第1節 結論

畜産経営を持続し、発展させていくには環境保全対策として家畜排せつ物の適切な処理を行い、畜産環境問題を未然に防ぐことが経営者の責務である。なかでも水質汚濁防止法にかかる「硝酸性窒素等」については、現在は暫定排水基準 500 mg/L が設定されているが、将来的には一律基準 100 mg/L が適用される可能性が高く、畜産廃水の窒素除去技術の開発は喫緊の課題となっている。畜産廃水は汚濁物質の濃度が高く C/N 比が低いため、従属栄養細菌による硝化脱窒法では曝気や有機物資材にかかるコストが高くなり、事業者の負担が大きい。そのため、硝化脱窒法より低コストで運用可能な窒素除去法としてアナモックス菌を利用したアナモックスプロセスの適用が期待されている。

本論文は、静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターの養豚廃水処理施設において偶発的に発生したアナモックス菌の集積の要因、および集積されたアナモックス菌により構築される加温を必要としない SNAD プロセスによる窒素除去について、2014 年から 7 年間にわたり行ってきた研究をまとめたものである。アナモックス菌の自然集積例は少なく、1 つの施設における長期的な調査の報告はこの研究が国内初である。

第 2 章では、同センターの養豚廃水処理施設において 2 年間にわたり曝気槽内の環境および水質を調査し、アナモックス菌の集積要因および槽内環境の変動が窒素除去能に与える影響について検討を行った。その結果、施設の廃水処理が良好に行われていること、平均 DO 濃度が 0.31 mg/L、pH が 7.4 とそれぞれがアナモックス菌の至適範囲内で維持されていること、アナモックス反応の基質である $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ が存在すること、倍加速度の遅いアナモックス菌が長い汚泥滞留時間により槽内に保持されることがアナモックス菌の集積要因として確認された。遺伝子学的解析により、アナモックス菌バイオフィームやグラニューールには *Candidatus Jettenia* をはじめとした特定のアナモックス菌が高度に集積され、それが長期にわたって存在していることを明らかにした。流入水の BOD/N 比が低く、従属栄養脱窒には不利な水質であっても高い窒素除去率が得られていることから、曝気槽内で $\text{NH}_4\text{-N}$ の部分亜硝化とアナモックス反応、および従属栄養脱窒が同時に進行する SNAD プロセスにより窒素除去が行われていることが示された。窒素除去能を低下させる要因としては、DO 濃度の上昇と $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積にともなう pH の下降および FNA 濃度の上昇によるアナモックス反応の阻害、または曝気不足により $\text{NH}_4\text{-N}$ の酸化が停滞したことによる基質の律速および FA による阻害の可能性が確認された。また、 $\text{NO}_3\text{-N}$ まで硝化が進むことも窒素除去能を低下させる要因となることが示された。これらのことから、安定した窒素除去プロセスの維持には DO 濃度を 0.3mg/L 以下、pH を 6.5–8.0 の範囲に安定させるための曝気コントロールが必要であることを明らかにした。

第 3 章では、曝気槽を模した小型試験装置を用い、第 2 章で明らかとなった FS 槽の曝気槽の環境を再現してアナモックス菌の集積試験を行った。その結果、試験開始から 142–174 日目にアナモックス菌バイオフィームの形成が確認され、FS 槽で示された集積要因を揃えることにより、養豚廃水でアナモックス菌が集積されることが確認された。また、担体を増設して槽内のアナモックス菌バイオマス量を増加させることで、窒素負荷量および窒素除

去速度が上昇し、窒素濃度が高くなる冬季の窒素処理能力の向上が期待されることが確認された。

第4章では、無加温条件下で集積されたアナモックス菌の低温への適応の可能性について検討を行った。アナモックス菌グラニュールは $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が高くなる低温期に豊富な基質の存在下で浮上することが明らかとなり、低温下においてもアナモックス活性を保持している可能性が示された。そこで、四半期別（1月：L-1、4月：L-2、7月：H-1、10月：H-2）にグラニュールを採取し、 $10\text{--}35^\circ\text{C}$ の範囲で 5°C 刻みに培養温度を設定してアナモックス活性を測定したところ、低温期のL-2で最大のアナモックス活性が記録された。最大活性は低温期のグラニュールL-1およびL-2では 30°C 、高温期のグラニュールH-1およびH-2では 35°C で記録され、低温期グラニュールは高温期グラニュールより低温で最大活性を示すことを確認した。また、温度の低下と共に活性も低下したが、L-1およびL-2の低下は緩やかで、最低温度の 10°C においても最大活性に対する活性がそれぞれ 27.0%および 33.9%を維持していたのに対し、H-1およびH-2では低下が大きく、低温期グラニュールが低温下でも高い活性を維持していることを明らかにした。アナモックス菌量はL-2が最も多く、低温期にアナモックス菌が集積されたことで高い活性を保持していたことが示された。次世代シーケンス解析により、門レベルではアナモックス活性の高かったL-1、L-2およびH-1では *Planctomycetes* の存在比が最も高かった一方で、アナモックス活性より脱窒活性が高かったH-2では脱窒菌が属する *Proteobacteria* の存在比が最も高いことが確認され、各グラニュールのアナモックス活性および脱窒活性は菌の存在比に比例するものと考えられた。属レベルの解析では、グラニュールのアナモックス菌は年間を通して *Candidatus Jettenia asiatica* が最優占種であったことが明らかとなり、*Candidatus Jettenia asiatica* が季節の水温変動に対応して低温に順化したと判断された。一方で、SNADプロセスにおいて $\text{NO}_2\text{-N}$ の利用で競合関係にあるNOBの生育は抑制されていることが確認された。施設の窒素除去速度は年間を通して一定であったことから、低温期は低温に順応し高度に集積されたアナモックス菌によるアナモックス反応が優位となり、高温期は従属栄養脱窒反応が優位となるSNADプロセスにより、加温を行わなくても除去速度が安定した窒素除去プロセスが構築されたものと判断した。

第5章では、FS槽に曝気槽のDO濃度を第2章で明らかにした至適DO濃度の範囲となるよう曝気量を制御するシステムを導入し、低水温期の窒素除去能に及ぼす影響および経済効果について検討した。曝気制御システムの導入によりDO濃度上昇にともなうアナモックス反応に対する阻害の発生が抑制され、窒素除去速度が安定した。その結果、試験期間を通して硝酸性窒素等の一律排水基準を達成することができた。さらに、制御前に比較して消費電力量を有意に削減することができ、ランニングコストの削減が可能となることが明らかとなった。

以上により、本研究では畜産廃水処理施設におけるアナモックス菌の集積要因について明らかにするとともに、窒素除去を安定化させるための運転条件を明らかにした。また、集積されたアナモックス菌が低温に順応して低温下でも高い活性を持つことを明らかにし、そのアナモックス菌を活用した加温を必要としないSNADプロセスによる安定した窒素除

去プロセスが成立することを明らかにすることができた。また、冬季における窒素除去の対策を提案することもできた。これらの成果は、養豚廃水処理施設において、既設の施設を利用した硝酸性窒素等の一律排水基準に対応可能な低コスト窒素除去システムの提供を可能とし、環境に配慮した畜産経営の維持発展に寄与することが期待される。

第2節 今後の展望および課題

今後、この窒素除去技術を実用化し普及するにあたっては、以下の課題についてより詳細に検討を重ねていく必要があると考える。

1. 曝気制御システムの改良

本研究において開発した曝気制御システムでは、DO濃度上昇を抑制することで処理の安定化を図ることに主眼がおかれており、その効果も確認できたが、曝気量の不足によりNH₄-Nの硝化が停滞したときの対策については未対応である。NH₄-Nが蓄積してpHが至適範囲より上昇した場合には曝気量を増やすなど、pHによる曝気量の制御も並行して行うことでこの問題を解決できる可能性があると考えられることから、DO濃度とpHの組み合わせによる曝気制御システムの構築について検討を行っていく。

2. FS槽で用いる担体の検討

流入水の窒素濃度が高くなる冬季に窒素除去能を向上させる対策として、上記の曝気制御システムの導入とともに、槽内のアナモックス菌バイオマス量を増やすことによる効果が示された。第3章の試験で用いた不織布担体はアナモックス菌の集積には有効であったが、FS槽での利用には課題も示された。そこで、重量が過大となることなくアナモックス菌バイオフィルムを集積できるFS槽向けの担体について検討を重ねているところである。

3. アナモックス菌種の niche differentiation の検討

本研究では *Candidatus Jettenia asiatica* がアナモックス菌の最優占種であることが明らかとなったが、フロックの粒径が小さくなるにつれ *Candidatus Brocadia* の存在比が増加することも確認された。また、廃水の種類が異なる SNAD プロセスでは *Candidatus Brocadia* や *Candidatus Kuenenia* が最優占種として報告されている。養豚廃水処理施設も個々の施設により汚水の条件が異なることから、本研究で示した条件の適用によりアナモックス菌が集積されたときに最優占種が異なる可能性も考えられる。最優占種となるアナモックス菌を決定する要因や、それらの菌種の低温への順応性などについて検討を行っていきたい。

謝 辞

本論文は、著者が静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターに入所してからの7年間における研究および立命館大学大学院理工学研究科環境都市専攻博士課程後期課程在学中の3年間の研究成果をまとめたものです。

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、丁寧なご指導を賜りました立命館大学理工学部教授惣田訓博士に心から感謝申し上げます。入学前からも、学会でお会いするたびにご意見をいただけたことは研究の励みとなっていました。今日に至るご縁をいただきましたことに心から感謝いたします。また、本論文の査読、ご校閲を賜り、ご指導をいただきました同教授神子直之博士および同教授樋口能士博士に深く感謝申し上げます。

本研究を始めるきっかけとなったアナモックス菌の存在を確認していただき、その後も多くの試験に多大なるご協力をいただくとともに、ご助言やご指導をいただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）畜産研究部門和木美代子博士に心から感謝申し上げます。同部門の福本泰之博士、安田知子博士には多くのご協力をいただきましたことを深く感謝申し上げます。また、遺伝子解析にご協力をいただいた農研機構生物機能利用研究部門上西博英博士と松本敏美博士に深謝いたします。

本研究は主として農研機構生物系特定産業技術研究支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業 28008AB」の助成を受けて実施しました。熊本大学工学部名誉教授古川憲治博士には研究支援者として、研究の進行にあたり多くの貴重なご助言やご指導をいただきましたことを心から感謝申し上げます。また、同じく研究支援者である畜産環境整備機構羽賀清典博士、元公益社団法人農林水産・食品産業技術振興協会岩崎和雄博士には多くのアドバイスをいただきましたことを深く感謝申し上げます。

静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センターにおきましても、大変多くの方にお世話になりました。杉山典博士および知久幹夫氏には、試験の実施にご協力をいただきましたことを感謝申し上げます。また、同センター長森比佐子氏、同研究統括官柴田昌利氏、さらに歴代のセンター長である森啓之氏、長谷川昌俊氏、川嶋和晴氏におきましては、本研究の遂行にあたりご理解とご協力をいただきましたことを心から感謝申し上げます。

立命館大学理工学部惣田研究室の学生の方々、特にチーム・アナモックスのメンバーとは、ゼミなどを通して意見交換を行い、有益な情報を得ることができたことを感謝申し上げます。コロナウイルス感染症の影響で、直接会って意見を交わせる機会が少なくなってしまうことが残念です。

最後に、私の博士課程進学を許して下さり、応援してくださいました亡父重信、母静子および息子の駿輔に感謝いたします。

本論文に関連する発表

論文

- 1) Ishimoto, C., Sugiyama, T., Matsumoto, T., Uenishi, H., Fukumoto, Y., Waki, M.: Full-scale simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification process for treating swine wastewater. *Water Sci. Technol.* 81, 456–465 (2020). <https://doi.org/10.2166/wst.2020.120>.
- 2) Ishimoto, C., Waki, M., Soda, S.: Adaptation of anammox granules in swine wastewater treatment to low temperatures at a full-scale simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification plant. *Chemosphere.* 282, 131027 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131027>.