

東京大学大学院新領域創成科学研究科  
環境学専攻社会文化環境コース

平成 17 年度

修士論文

**実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築と  
硝化細菌群集解析**

**Development of partial nitrification and analysis of nitrifying bacteria  
in laboratory-scale reactor**

2006 年 1 月提出

指導教員 味埜 俊 教授

46831 田中 秀治

# 目次

|           |  |
|-----------|--|
| 第1章 序論    |  |
| 1.1       | はじめに   |
| 1.2       | 研究の目的  |
| 1.3       | 研究の流れと本論文の構成   |
| 第2章 既往の知見 |  |
| 2.1       | 自然界における窒素循環と微生物                                      |
| 2.2       | 生物学的窒素除去   |
| 2.2.1     | 生物学的排水処理   |
| 2.2.2     | 生物学的窒素除去   |
| 2.2.3     | 亜硝酸型硝化反応と新奇生物学的窒素除去                                  |
| 2.3       | 独立栄養硝化細菌   |
| 2.3.1     | アンモニア酸化細菌  |
| 2.3.2     | 亜硝酸酸化細菌  |
| 2.4       | 亜硝酸型硝化反応 ( Partial-nitrification )                   |
| 2.4.1     | pH   |
| 2.4.2     | 遊離アンモニア  |
| 2.4.3     | 溶存酸素   |
| 2.4.4     | 温度   |
| 2.4.5     | 塩濃度  |
| 2.5       | 新日本製鐵 ( 株 ) 安水処理硝化脱窒試験プラントにおける亜硝酸型硝化反応               |
| 2.5.1     | 新日本製鐵 ( 株 ) 試験プラント ( ミニプラント ) の概要                    |
| 2.5.3     | チオ硫酸と亜硝酸型硝化反応  |
| 2.6       | 分子生物学的手法を用いた環境微生物群集解析                                |
| 2.6.1     | 環境からの DNA の抽出  |
| 2.6.2     | Polymerase Chain Reaction ( PCR ) 法                  |
| 2.6.3     | Cloning  |
| 2.6.3     | Real-time PCR  |
| 2.6.4     | Terminal Restriction Fragment Length ( TRFLP )       |
| 2.6.5     | Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization ( FISH ) 法 |
| 第3章 実験の方法 |  |
| 3.1       | 実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築                                  |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.1.1 | リアクターのセットアップ                                      | 29 |
| 3.1.2 | リアクターの運転条件  | 31 |
| 3.1.3 | リアクターの水質モニタリング                                    | 34 |
| 3.2   | 硝化細菌群集解析  | 37 |
| 3.2.1 | 活性汚泥サンプルの採取                                       | 37 |
| 3.2.2 | DNA の抽出   | 38 |
| 3.2.3 | FISH (Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization ) | 38 |
| 3.2.4 | PCR primer の選定と PCR 条件                            | 40 |
| 3.2.5 | QPrimer-PCR                                       | 42 |
| 3.2.6 | PCR-Cloning-Sequencing                            | 44 |
| 3.2.7 | PCR-TRFLP   | 46 |

## 第4章 実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築

---

|       |                          |    |
|-------|--------------------------|----|
| 4.1   | 実験室規模活性汚泥リアクター実験結果       | 48 |
| 4.1.1 | 運転条件の変遷とリアクター水質モニタリング結果  | 48 |
| 4.1.2 | 硝化反応速度の変化                | 52 |
| 4.2   | 考察                       | 57 |
| 4.2.1 | 運転条件の変更と処理成績の変化          | 57 |
| 4.2.2 | 流入水中のチオ硫酸イオンの有無と亜硝酸型硝化反応 | 59 |
| 4.3   | まとめ                      | 60 |

## 第5章 硝化細菌群集解析

---

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.1   | <i>amoA</i> を標的としたアンモニア酸化細菌 (AOB) 群集解析結果               | 62 |
| 5.1.1 | QPrimer-PCR によるβ-AOB 由来 <i>amoA</i> の定量                | 63 |
| 5.1.2 | PCR-Cloning-Sequencing によるβ-AOB 由来 <i>AmoA</i> 系統樹の作成  | 63 |
| 5.1.3 | PCR-TRFLP によるβ-AOB 種構成変化の追跡                            | 66 |
| 5.2   | 亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) 群集解析結果       | 68 |
| 5.2.1 | FISH による優占 NOB 属の同定                                    | 69 |
| 5.2.2 | QPrimer-PCR による <i>Nitrobacter</i> 由来 16S rDNA コピー数の定量 | 70 |
| 5.2.3 | PCR-Cloning-Sequencing による <i>Nitrobacter</i> 存在種の同定   | 70 |
| 5.3   | 考察   | 73 |
| 5.3.1 | リアクター処理水質の変動と硝化細菌由来 DNA コピー数の変動                        | 73 |
| 5.3.2 | 亜硝酸酸化速度と <i>Nitrobacter</i> 数の変動                       | 74 |
| 5.3.3 | リアクター処理水質の変動と AOB 種構成変化                                | 79 |
| 5.4   | まとめ  | 80 |

## 第6章 総括

---

|                  |     |
|------------------|-----|
| 6.1 研究の成果        | 81  |
| 6.2 課題と展望        | 83  |
| 謝辞               | 84  |
| 引用文献             | 85  |
| 付録： 水質モニタリング全データ | 93  |
| クローン塩基配列情報       | 113 |

# 第 1 章 序論

## 1.1 はじめに

---

閉鎖性水域における富栄養化を抑止するためには、水域へ排出される廃水中の栄養塩の削減が重要と考えられる。現在、富栄養化原因物質の一つである窒素を廃水中から除去する技術として硝化脱窒法が実下水処理場を中心に広く普及している。硝化脱窒法は、自然界での窒素循環にかかわる微生物、すなわち硝化細菌群と脱窒細菌群の特性を活かした生物学的窒素除去法である。

硝化脱窒法では、廃水処理システムに流入する溶存態窒素の主成分であるアンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) を硝化細菌群の働きで亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) を経て硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) まで酸化 (硝化) した後に、その硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) を脱窒細菌群によって窒素ガス ( $\text{N}_2$ ) まで還元 (脱窒) することで廃水からの窒素除去を実現している。そのため、本法では硝化の際に酸素が、脱窒の際に還元力 (有機物) が要求され、1 mol のアンモニア態窒素を除去するのに 2 mol の酸素 ( $\text{O}_2$ ) と 5 mol の還元力 ( $[\text{H}]$ ) が必要となる。

この硝化脱窒法を効率的化する微生物反応として「亜硝酸型」硝化反応が注目されている。亜硝酸型硝化反応とは、前述の硝化反応を  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  までの酸化で停止させた反応を指す。この反応に続けて脱窒反応を行うことにより (亜硝酸型硝化脱窒)、通常の硝化脱窒反応が要求する酸素、還元力がそれぞれ 25%、40% 削減できることになる (理論値)。また、亜硝酸型硝化反応の安定的な制御は、1995 年にオランダ・デルフト工科大学の研究グループにより報告された嫌気性アンモニア酸化 (Anaerobic Ammonium Oxidization; anammox) (Mulder et al. 1995) とよばれる、アンモニア態窒素と亜硝酸態窒素を基質とした脱窒反応を利用した最も先進的な生物学的窒素除去法の実用化に不可欠な要素でもある。

ところで、硝化を担う硝化細菌群は大きく二つのグループに分けられる。すなわち  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  を  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  まで酸化するアンモニア酸化細菌群 (AOB) と、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  を硝酸態窒素まで酸化する亜硝酸酸化細菌群 (NOB) である。亜硝酸型硝化反応の実現ためには、AOB を存在させつつ NOB を排除すればいい。NOB の選択的な排除による亜硝酸型硝化反応の実現のために、現在まで主に、遊離アンモニア ( $\text{NH}_3$ ) や亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) を高濃度に保つ方法 (Anthonisen et al. 1976)、水温を高温 (30-40 ) に保つ方法 (Hellings et al. 1998)、酸素濃度を低くする (曝気量を小さくする) 方法 (Kuai & Verstraete 1998) などが検討されている。しかし、相対的に AOB よりも NOB のほうがより少ない栄養で生育できる (Rittmann & McCarty 2001) ことが、安定的な亜硝酸型硝化反応の実現を困難にしている。

そのような中、新日本製鐵 (株) において、製鐵過程で排出される高濃度のアンモニア等の窒素成分やフェノール類、チオシアン、チオ硫酸、タール状油分などを含む「安水」

の硝化脱窒法による処理を試みたところ期せずして安定的な亜硝酸型硝化反応が観察された。この試験プラントにおける亜硝酸型硝化反応を詳細に解析することは、亜硝酸型硝化反応の実用化に向けた新たな知見の獲得に繋がると期待され、本研究における根源的な動機となった。

本研究では、新日本製鐵（株）安水処理試験プラントの運転条件を参考に実験室規模活性汚泥リアクター（廃水処理マイクロコズム）を構築し、詳細な水質モニタリングを行うとともに、硝化反応の主役である硝化細菌群（AOB および NOB）の挙動を解析することとした。そして、本リアクターにおいて得られた亜硝酸型硝化反応と硝化細菌群集の挙動との関係性を示し、亜硝酸型硝化反応制御への提言を行うことを目指した。

## 1.2 研究の目的

---

本研究の目的は以下の 2 点に集約される。

- 1) 実験室規模活性汚泥リアクターにおいて亜硝酸型硝化反応を得る。
- 2) 1)のリアクターにおける硝化細菌群集の挙動を解析し、亜硝酸型硝化反応と硝化細菌群集の関係性を見出す。
- 3) 1), 2)を踏まえ、亜硝酸型硝化反応の安定的な維持にかかわる要素を記述する。

1.1 で既述の通り、亜硝酸型硝化反応についての研究報告は少なくないが、その安定的な制御方法は確立されていない。よって、本研究における最大の難所が目的 1)であった。リアクターの運転管理条件は、新日本製鐵（株）の試験プラントにおけるそれを参考にし、目的の達成を目指した。また目的 2)への取り組みとして、分子生物学的手法を用いてリアクター内硝化細菌群集の定量的・定性的な解析を行い、構築したリアクターにおける水質モニタリング結果とあわせた考察を行った。また 3)では 1)・2)を踏まえ、安定的に亜硝酸型硝化反応を維持するための条件を整理することで、亜硝酸型硝化反応の実用化へ向けた提言を行うことを狙いとした。

### 1.3 研究の流れと本論文の構成

本研究の流れを Fig. 1-1 に示した。本研究における実験は「実験室規模亜硝酸蓄積型硝化(脱窒)リアクターの構築・運転管理」、「処理水質の分析」、「活性汚泥中の硝化細菌群集挙動解析」の3つの部分から構成される。

「実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築・運転管理」では、研究の土台となる亜硝酸型硝化(脱窒)反応を行う廃水処理反応槽の構築・安定的な運転を目指した。

「処理水質の分析」では、構築されたリアクターの処理水質を定期的に測定し、運転条件と処理水質の関係性を検討することとした。

「活性汚泥中の硝化細菌群集挙動解析」では、リアクターから定期的にサンプリングした活性汚泥(微生物群集)中の硝化細菌群を、定量的・定性的に解析し、硝化細菌群集の挙動を捉えることを目的とした。

これら実験から得られた情報をもとに、「運転条件・処理成績と硝化細菌群集構造の関係性および処理機構の微生物生態学的な考察」を行い、最終的には「亜硝酸型硝化反応制御への提言」を目標とした。

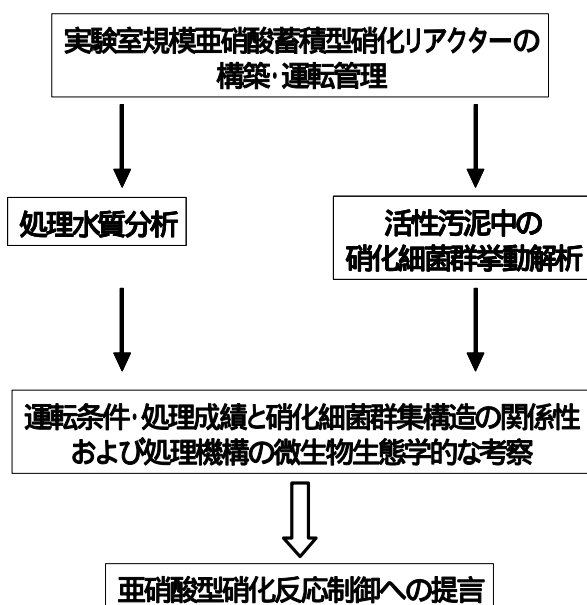


Fig. 1-1 研究の流れ

本論文は全 6 章から構成される。各章を概説する。

## 第 1 章 序論

本章。研究背景およびその目的等。

## 第 2 章 既往の知見

本研究に関わる既往の研究報告を簡潔にまとめた。

## 第 3 章 実験方法

本研究で用いた実験材料，実験方法について詳説した。

## 第 4 章 実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築

第 1 章 1.2 で述べた目的 1)に関する研究成果をまとめた。実験室規模のリアクターにおいて亜硝酸型硝化反応を得るまでの水質モニタリング結果と運転管理条件から，本リアクターで観察された亜硝酸型硝化反応について考察した。

## 第 5 章 硝化細菌群集解析

第 1 章 1.2 目的 2)に関する研究成果をまとめた。第 4 章で構築されたリアクターにおける硝化細菌（アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌）の挙動解析結果を示し，リアクター水質モニタリング結果と併せた考察から，本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応と硝化細菌群集の挙動との関係性について考察した。

## 第 6 章 総括

本研究全体の成果と，本研究が為しえなかった部分についてまとめた。



# 第 1 章 序論

## 1.1 はじめに

---

閉鎖性水域における富栄養化を抑止するためには、水域へ排出される廃水中の栄養塩の削減が重要と考えられる。現在、富栄養化原因物質の一つである窒素を廃水中から除去する技術として硝化脱窒法が実下水処理場を中心に広く普及している。硝化脱窒法は、自然界での窒素循環にかかわる微生物、すなわち硝化細菌群と脱窒細菌群の特性を活かした生物学的窒素除去法である。

硝化脱窒法では、廃水処理システムに流入する溶存態窒素の主成分であるアンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) を硝化細菌群の働きで亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) を経て硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) まで酸化 (硝化) した後に、その硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) を脱窒細菌群によって窒素ガス ( $\text{N}_2$ ) まで還元 (脱窒) することで廃水からの窒素除去を実現している。そのため、本法では硝化の際に酸素が、脱窒の際に還元力 (有機物) が要求され、1 mol のアンモニア態窒素を除去するのに 2 mol の酸素 ( $\text{O}_2$ ) と 5 mol の還元力 ( $[\text{H}]$ ) が必要となる。

この硝化脱窒法を効率的化する微生物反応として「亜硝酸型」硝化反応が注目されている。亜硝酸型硝化反応とは、前述の硝化反応を  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  までの酸化で停止させた反応を指す。この反応に続けて脱窒反応を行うことにより (亜硝酸型硝化脱窒)、通常の硝化脱窒反応が要求する酸素、還元力がそれぞれ 25%、40% 削減できることになる (理論値)。また、亜硝酸型硝化反応の安定的な制御は、1995 年にオランダ・デルフト工科大学の研究グループにより報告された嫌気性アンモニア酸化 (Anaerobic Ammonium Oxidization; anammox) (Mulder et al. 1995) とよばれる、アンモニア態窒素と亜硝酸態窒素を基質とした脱窒反応を利用した最も先進的な生物学的窒素除去法の実用化に不可欠な要素でもある。

ところで、硝化を担う硝化細菌群は大きく二つのグループに分けられる。すなわち  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  を  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  まで酸化するアンモニア酸化細菌群 (AOB) と、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  を硝酸態窒素まで酸化する亜硝酸酸化細菌群 (NOB) である。亜硝酸型硝化反応の実現ためには、AOB を存在させつつ NOB を排除すればいい。NOB の選択的な排除による亜硝酸型硝化反応の実現のために、現在まで主に、遊離アンモニア ( $\text{NH}_3$ ) や亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) を高濃度に保つ方法 (Anthonisen et al. 1976)、水温を高温 (30-40 ) に保つ方法 (Hellings et al. 1998)、酸素濃度を低くする (曝気量を小さくする) 方法 (Kuai & Verstraete 1998) などが検討されている。しかし、相対的に AOB よりも NOB のほうがより少ない栄養で生育できる (Rittmann & McCarty 2001) ことが、安定的な亜硝酸型硝化反応の実現を困難にしている。

そのような中、新日本製鐵 (株) において、製鐵過程で排出される高濃度のアンモニア等の窒素成分やフェノール類、チオシアン、チオ硫酸、タール状油分などを含む「安水」

の硝化脱窒法による処理を試みたところ期せずして安定的な亜硝酸型硝化反応が観察された。この試験プラントにおける亜硝酸型硝化反応を詳細に解析することは、亜硝酸型硝化反応の実用化に向けた新たな知見の獲得に繋がると期待され、本研究における根源的な動機となった。

本研究では、新日本製鐵（株）安水処理試験プラントの運転条件を参考に実験室規模活性汚泥リアクター（廃水処理マイクロコズム）を構築し、詳細な水質モニタリングを行うとともに、硝化反応の主役である硝化細菌群（AOB および NOB）の挙動を解析することとした。そして、本リアクターにおいて得られた亜硝酸型硝化反応と硝化細菌群集の挙動との関係性を示し、亜硝酸型硝化反応制御への提言を行うことを目指した。

## 1.2 研究の目的

---

本研究の目的は以下の 2 点に集約される。

- 1) 実験室規模活性汚泥リアクターにおいて亜硝酸型硝化反応を得る。
- 2) 1)のリアクターにおける硝化細菌群集の挙動を解析し、亜硝酸型硝化反応と硝化細菌群集の関係性を見出す。
- 3) 1), 2)を踏まえ、亜硝酸型硝化反応の安定的な維持にかかわる要素を記述する。

1.1 で既述の通り、亜硝酸型硝化反応についての研究報告は少なくないが、その安定的な制御方法は確立されていない。よって、本研究における最大の難所が目的 1)であった。リアクターの運転管理条件は、新日本製鐵（株）の試験プラントにおけるそれを参考にし、目的の達成を目指した。また目的 2)への取り組みとして、分子生物学的手法を用いてリアクター内硝化細菌群集の定量的・定性的な解析を行い、構築したリアクターにおける水質モニタリング結果とあわせた考察を行った。また 3)では 1)・2)を踏まえ、安定的に亜硝酸型硝化反応を維持するための条件を整理することで、亜硝酸型硝化反応の実用化へ向けた提言を行うことを狙いとした。

### 1.3 研究の流れと本論文の構成

本研究の流れを Fig. 1-1 に示した。本研究における実験は「実験室規模亜硝酸蓄積型硝化(脱窒)リアクターの構築・運転管理」、「処理水質の分析」、「活性汚泥中の硝化細菌群集挙動解析」の3つの部分から構成される。

「実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築・運転管理」では、研究の土台となる亜硝酸型硝化(脱窒)反応を行う廃水処理反応槽の構築・安定的な運転を目指した。

「処理水質の分析」では、構築されたリアクターの処理水質を定期的に測定し、運転条件と処理水質の関係性を検討することとした。

「活性汚泥中の硝化細菌群集挙動解析」では、リアクターから定期的にサンプリングした活性汚泥(微生物群集)中の硝化細菌群を、定量的・定性的に解析し、硝化細菌群集の挙動を捉えることを目的とした。

これら実験から得られた情報をもとに、「運転条件・処理成績と硝化細菌群集構造の関係性および処理機構の微生物生態学的な考察」を行い、最終的には「亜硝酸型硝化反応制御への提言」を目標とした。

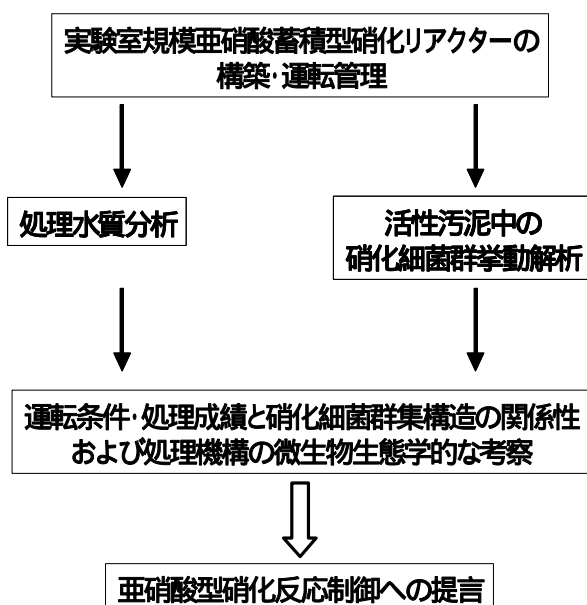


Fig. 1-1 研究の流れ

本論文は全 6 章から構成される。各章を概説する。

## 第 1 章 序論

本章。研究背景およびその目的等。

## 第 2 章 既往の知見

本研究に関わる既往の研究報告を簡潔にまとめた。

## 第 3 章 実験方法

本研究で用いた実験材料，実験方法について詳説した。

## 第 4 章 実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築

第 1 章 1.2 で述べた目的 1)に関する研究成果をまとめた。実験室規模のリアクターにおいて亜硝酸型硝化反応を得るまでの水質モニタリング結果と運転管理条件から，本リアクターで観察された亜硝酸型硝化反応について考察した。

## 第 5 章 硝化細菌群集解析

第 1 章 1.2 目的 2)に関する研究成果をまとめた。第 4 章で構築されたリアクターにおける硝化細菌（アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌）の挙動解析結果を示し，リアクター水質モニタリング結果と併せた考察から，本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応と硝化細菌群集の挙動との関係性について考察した。

## 第 6 章 総括

本研究全体の成果と，本研究が為しえなかった部分についてまとめた。

## 第2章 既往の知見

本章では，本研究にかかわる既往の知見について整理した。

### 2.1 自然界における窒素循環と微生物

自然界における窒素循環とそれに関わる微生物についての概念図を Fig. 2-1 に示した。われわれを取り巻く大気の主成分は窒素である。生物は，生体を構成する核酸，アミノ酸等の合成に窒素を必要とするが，ほとんどの生物は大気中の窒素 ( $N_2$ ) を直接利用することはできない。シアノバクテリアやある種の植物の根に共生する土壌細菌などの少数の生物のみが大気中窒素をアンモニア ( $NH_3$ ,  $NH_4^+$ ) に変換（窒素固定）し，利用できる。ある微生物はそうにしてできたアンモニアを酸化し，亜硝酸 ( $NO_2^-$ ) や硝酸 ( $NO_3^-$ ) を生成する（硝化）。また，ある微生物は硝酸を還元し，窒素を再び窒素分子 ( $N_2$ ) として大気中に放出する（脱窒）。より高次の生物，たとえば植物はこのような循環サイクルのなかで生成されたアンモニアや硝酸を窒素源として根から吸収・利用（同化・有機化）し，脊椎動物は植物が合成したアミノ酸などを摂取することで生体を維持する。生体が分解されると有機化された窒素は再び無機態窒素として循環される。

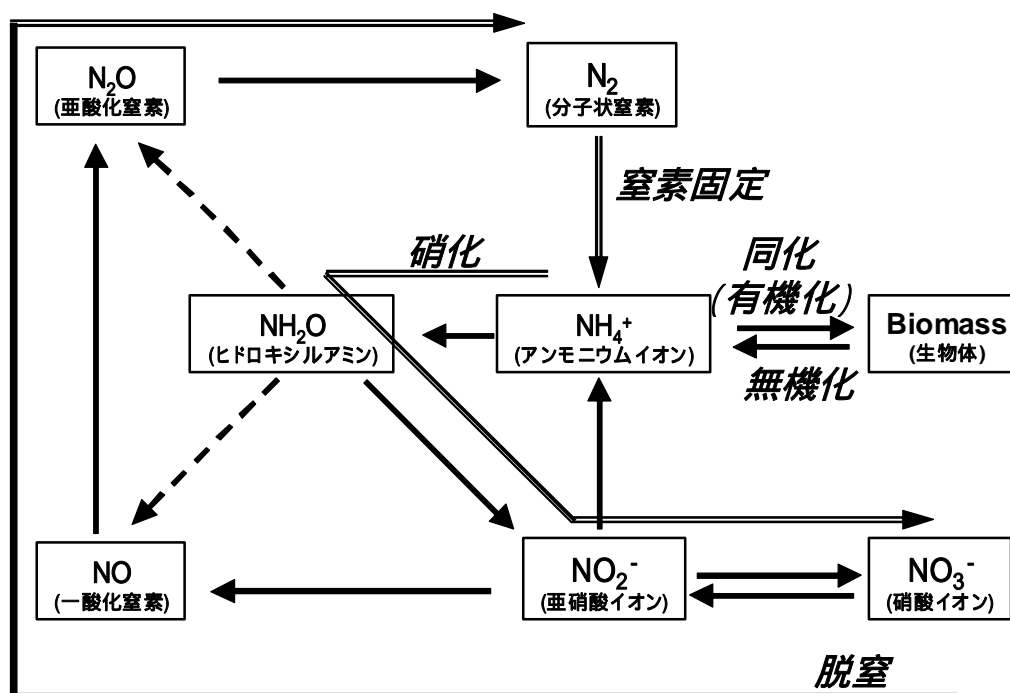


Fig. 2-1 自然界における窒素循環 (Ye & Thomas, 2001 を一部改変)

## 2.2 生物学的窒素除去

1.1 で述べたように，微生物が自然界における窒素循環に寄与するところは大きい。このような微生物の働きを利用した窒素除去法が，実下水処理を中心に活用されている。以下に生物学的手法を利用した排水処理システム，窒素除去システムについて概説する。

### 2.2.1 生物学的排水処理

自然界における物質循環に寄与する生物を集中させた排水の浄化することを生物学的排水処理という。代表的な生物学的排水処理法に，本研究でも用いた活性汚泥法がある。活性汚泥法には様々な変法が存在するが，その基本形は，高濃度の微生物群集（＝活性汚泥）を維持した処理槽内に大量の酸素を供給し（曝気），排水中有機物の微生物による酸化分解を促進するもの（標準活性汚泥法，Fig. 2-2）である。

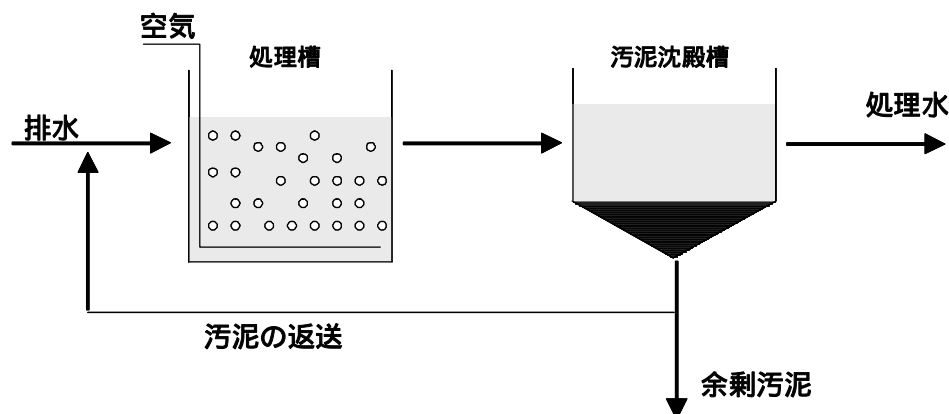


Fig. 2-2 標準活性汚泥法

### 2.2.2 生物学的窒素除去

実排水処理場などに広く普及している生物学的窒素除去法の一つに活性汚泥を用いた硝化脱窒法がある。本法は，標準活性汚泥法（Fig. 2-2）において自然界における窒素循環に関わる微生物の働きを強調させる工夫を取り込んだものである。

Fig. 2-3 に最も単純な硝化脱窒法を示した。標準活性汚泥法と異なり，硝化脱窒法では，好気(硝化)槽と嫌気(脱窒)槽の二つの処理槽が必要となる。好気槽では，有機成分が酸化分解されるとともに溶存態窒素の主成分であるアンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) が亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) を経て硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) まで酸化（硝化）される。嫌気槽では，硝化槽で生成された硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) が分子状窒素 ( $\text{N}_2$ ) まで還元（脱窒）される。

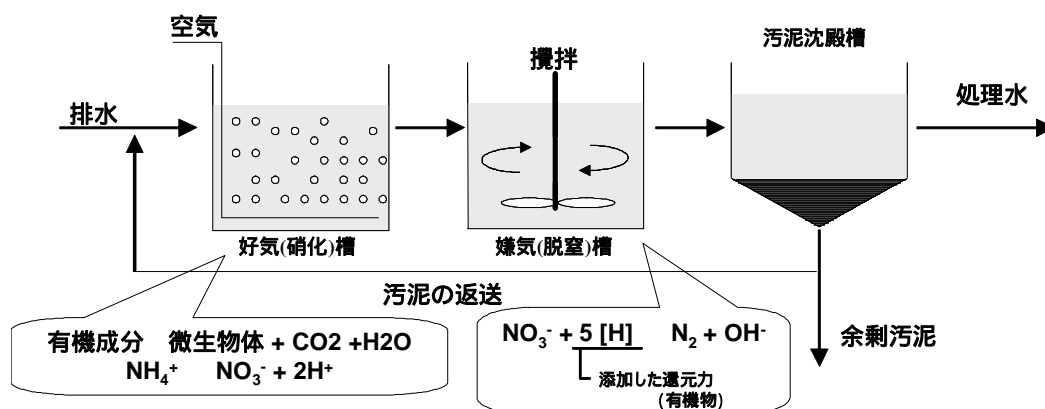
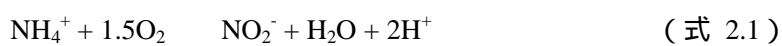


Fig. 2-3 硝化脱窒プロセス

硝化脱窒法に関わる微生物反応を次式 2.1 から 2.4 に示した。硝化反応が要求する酸素量は大きく、1 mol のアンモニアを完全に硝化するには 3 mol の分子状酸素が必要となり、副産物として  $\text{H}^+$  が生成されるので処理槽内の pH が低下する (式 2.1, 2.2)。また、脱窒反応には電子供与体 (還元力) が必要であり、1 mol の硝酸を分子状窒素まで完全に脱窒するためには 5 mol の水素の還元力に相当する (式 2.3)。硝化反応とは反対に副産物として  $\text{OH}^-$  を生成され、pH が上がる。



脱窒の際に要求される電子供与体 (還元力) には通常メタノールや酢酸などの安価な有機物が利用される。しかし、排水中の有機成分を有効に活用することができれば、還元力の添加に伴うコストや手間を削減できる。Fig. 2-4 に示した、硝化脱窒法の変法である硝化液循環式硝化脱窒法はこの考えに立った合理的な手法である。

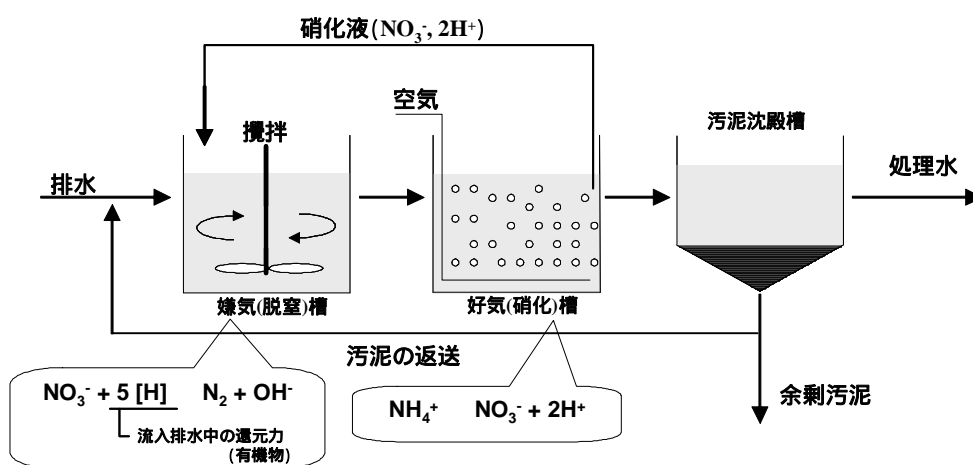


Fig. 2-4 硝化液循環式硝化脱窒プロセス

硝化液循環式硝化脱窒法では，流入排水はまず嫌気条件の脱窒槽に導かれ，後段の硝化槽から循環される硝酸を含んだ循環水と混合される。こうすることによって，排水中の有機成分を利用した脱窒が実現でき，有機成分と脱窒による窒素除去を同時に行える。脱窒工程を終えた汚泥混合液は後段の硝化槽に送られ，残存する有機成分の酸化分解とアンモニア態窒素の硝化が起こる。また，硝化液を循環させることで硝化反応や脱窒反応で起こる pH の変動が低く抑えられる。本法は，処理プロセスの合理性と装置の構造のシンプルさから，実下水処理において普及している。

### 2.2.3 亜硝酸型硝化反応(Partial nitrification)と新奇生物学的窒素除去法

2.2.2 で紹介した，微生物による硝化脱窒反応を利用した手法に対して，より洗練された生物学的窒素除去法がいくつか提案されている。本研究が注目した亜硝酸型硝化反応(Partial nitrification)は，提案されている新奇生物学的窒素除去法の肝になる反応である。

#### (1) 亜硝酸型硝化反応(Partial nitrification)

亜硝酸型硝化反応とは，硝化反応の基質とアンモニア( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )を硝酸( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )まで酸化せず，亜硝酸( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )までの酸化で停止させた反応を指す。

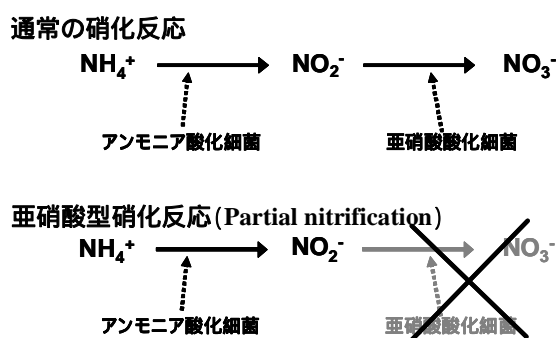


Fig. 2-5 亜硝酸型硝化反応の概念

Fig. 2-5 に示したように，通常の硝化反応はアンモニア酸化細菌によるアンモニア( $\text{NH}_4^+$ )の亜硝酸( $\text{NO}_2^-$ )までの酸化と，亜硝酸酸化細菌による亜硝酸( $\text{NO}_2^-$ )の硝酸( $\text{NO}_3^-$ )までの酸化という，連続した二段階の反応からなる。つまり，亜硝酸型硝化反応の実現は，硝化反応の過程から亜硝酸酸化細菌による亜硝酸の酸化が選択的に排除されたときになされる。しかし，安定した亜硝酸型硝化反応を得るための手法が現時点ではほとんど確立されておらず(本章 2.4 参照)，排水処理への実用には至っていない。以降述べる新奇生物学的窒素除去法には，この亜硝酸型硝化反応を利用したものが多くあり，この反応の制御の確立がより洗練された手法の実現の大きな課題となっている。



## (2) 新奇生物学的窒素除去法

現在研究が進められている生物学的窒素除去法は、Fig. 2-6 で示した二つの概念を踏襲したものである。

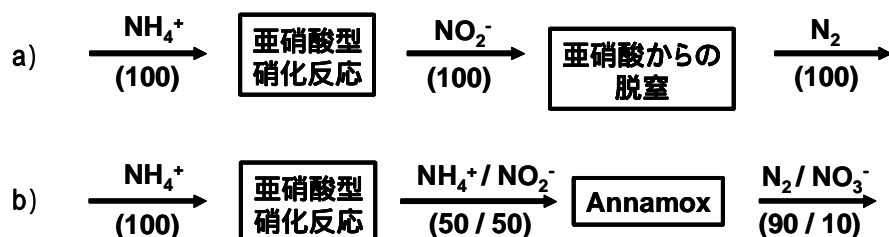


Fig. 2-6 新奇生物学的窒素除去法の概念

Fig. 2-6a)は、亜硝酸型硝化反応を利用したもっとも基本的な生物学的窒素除去法である。硝化反応を亜硝酸の生成までで止め、亜硝酸から脱窒反応を行うことで、理論的に通常の硝化脱窒反応が要求する酸素、還元力がそれぞれ 25%、40%削減できる。

Fig. 2-6b) における anammox とは anaerobic ammonium oxidation (嫌気性アンモニア酸化細菌) の略称であり、現在もっとも注目を集めている微生物反応のひとつである。anammox は、等モルのアンモニアと亜硝酸から窒素分子を生成するため、有機物などの電子供与体を必要とする従来の脱窒反応とは一線を画する。しかし、anammox 反応を行う微生物の増殖速度はきわめて小さく、いかに処理槽内に高濃度の菌体を集積するかが課題となっている。

以下に、Fig. 2-6 の概念をもとに現在までに提案されている新奇生物学的窒素除去プロセスの代表的なものを紹介する。

### SARON ( Single reactor system for high rate ammonia removal over nitrite )

亜硝酸型硝化反応を実現した数少ないプロセスの一つである。高濃度アンモニアの存在下で、溶存酸素 ( DO ) 0.4mg/L 以下 ( Schmidt et al., 2003 ), 温度 26 以上, pH7-8 に制御することで亜硝酸型硝化反応を実現した (Schmidt et al. 2003, Hellinga et al. 1998)。本法は anammox と併用され、実下水処理に利用された実績がある ( Mulder et al. 2001 )。

### Canon ( Completely autotrophic nitrigen removal over nitrite )

亜硝酸型硝化反応と anammox 反応を 1 槽のリアクターで行うプロセス ( Schmidt et al., 2003 )。好気下でアンモニア酸化反応が起こる際に酸素が消費されることにより嫌気環境が作られることを利用している。

### OLAND ( Oxygen-limited nitrification and denitrification )

1 槽のリアクターで亜硝酸型硝化脱窒反応 ( Fi. 2-6a ))を行うというものである ( Kuai

and Verstraete 1998, Schmidt et al. 2003)。処理槽内の DO を低くコントロールすることのみによっている。

## 2.3 独立栄養硝化細菌

---

本研究では、排水処理系における亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification) を研究の主題とし、独立栄養硝化細菌に注目した解析を多く行った。独立栄養硝化細菌は、硝化反応の主役であり、アンモニア ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) を亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) や硝酸 ( $\text{NO}_3^-$ ) に酸化する過程で生じるエネルギーを用いて炭酸ガスを同化する化学合成独立栄養細菌である。硝化細菌はアンモニアを亜硝酸まで酸化するアンモニア酸化細菌 (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB) と、亜硝酸を硝酸まで酸化する亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) に大別される。以下に、AOB、NOB についての知見を整理する。

### 2.3.1 アンモニア酸化細菌 (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB)

#### (1) アンモニア酸化細菌の系統分類

現在までに、アンモニア酸化細菌 (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB) として 5 つの属、*Nitrosomonas* *Nitrosococcus* *Nitrospira* *Nitrosolobus* *Nitrovibrio* が知られている (Prosser 1989, Koops et al. 2003)。これらの属名は当初、細胞の外形態と細胞内膜の特徴をもとに決定された。

分子生物学的手法の発展に伴い単離培養された AOB の 16S rRNA 塩基配列を用いた系統解析が行われてきた (Head et al. 1993, Teske et al. 1994; Pommerening-Röser et al. 1996)。その結果、AOB は Betaproteobacteria ( $\beta$ -proteobacteria) あるいは Gammaproteobacteria ( $\gamma$ -proteobacteria) に分類されることが明らかとなった (Head et al., 1993; Teske, et al., 1994)。Fig. 2-7 に 16S rRNA に基づく、AOB の系統樹を示した。

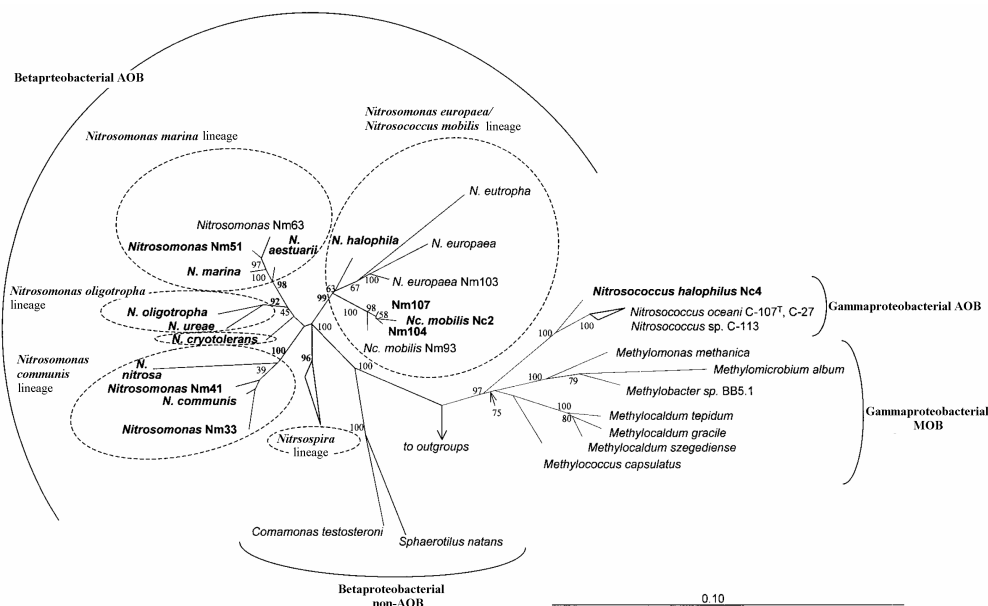


Fig. 2-7 16S rRNA 塩基配列に基づいた AOB の系統関係 (Purkhold et al. 2000 を一部改変)

16S rRNA を用いた系統解析のほかに，AOB が共通して有するタンパク質である ammonia monooxygenase subunit A (AmoA) をコードする遺伝子 (*amoA*) に注目した系統解析も積極的に行われており，16S rRNA を用いた系統解析との比較から，*amoA* による系統解析は十分に意義のあるものであるとされている (Mc Tavish et al. 1993; Klotz and Norton 1995; Suwa et al. 1997; Purkhold et al. 2000; Aakra et al. 2001, Purkhold et al. 2003)。

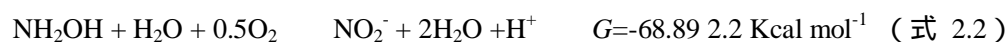
## (2) 生理学的・生化学的性質

アンモニア酸化細菌は独立栄養（化学無機独立）細菌であり，2つの酵素を用いた二段階の化学反応によりアンモニアを亜硝酸へ酸化する際に生成されるエネルギーを利用し，炭酸ガスを固定することで菌体を生成する（式 2.1, 2.2）。

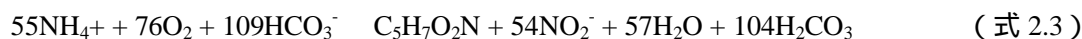
AMO (ammonia monooxygenase) によるアンモニア酸化



HMO (hydroxylamine oxidoreductase) によるヒドロキシルアミン酸化



また，アンモニアの亜硝酸への酸化反応で得られたエネルギーを用いて，式 2.3 のように炭酸ガスを固定し，菌体を合成する。



### (3) アンモニア酸化細菌の分子生物学的研究

AOB の 16SrRNA 系統樹解析の研究がはじめられて以来、次々に PCR primer や、dot-blot hibridization 及び FISH 用の probe が開発されてきた (Koops et al., 2003)。

AOBに限らず、これら primer や probe を用いて環境微生物の解析を行う際には、primer、probe の感受性 (より多くの目的微生物を検出できること) と特異性 (目的の微生物のみをより選択的に検出できること) が重要となってくる。特に、多様性の研究においては、顕著なバイアスを避けるために高い感受性ほどよく低い特異性が推奨されている (Koops et al., 2003)。

Table 2-1 に現在までに知られている AOB を標的とした primer、probe の代表的なものを一覧で示した。

Table 2-1 AOB に特異的な既存の primer および probe(本表に記載した文献の中には巻末の引用文献一覧に掲載していないものも含まれる)

| Primer or Probe | Target   | Specificity   | Ref.                          |
|-----------------|----------|---|-------------------------------|
| NM-75           | 16S rRNA | Terrestrial <i>Nitrosomonas</i> spp.                            | Hiorns et al.1995             |
| NS-85           | 16S rRNA | <i>Nitrosococcus mobilis</i>                                    | Hiorns et al.1995             |
| NmlI            | 16S rRNA | <i>Nitrosospira</i> spp.  | Hiorns et al.1995             |
| NSMR32f         | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas communis</i> lineage                            | Pommerening-Röser et al. 1996 |
| NSMR71f         | 16S rRNA | <i>Nitrosospira tenuis</i> -like AOB                            | Burrell et al. 2001           |
| NSMR34          | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas marina</i> -like AOB                            | Burrell et al. 2001           |
| NSMR76          | 16S rRNA | <i>Nitrosospira tenuis</i> -like AOB                            | Burrell et al. 2001           |
| NitA            | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas marina</i> -like AOB                            | Burrell et al. 2001           |
| βAMOf           | 16S rRNA | βAOB  | Voytek & Ward 1995            |
| NSPM            | 16S rRNA | βAOB  | McCaig et al. 1994            |
| Nm0             | 16S rRNA | βAOB  | Silyn-Roberts & Lewis 2001    |
| Nsm 156         | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas</i> spp.  | Pommerening-Röser et al. 1996 |
| NmV             | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas</i> spp. <i>Nitrosococcus mobilis</i>           | Mobarry et al. 1996           |
| CTO189f A/B-GC  | 16S rRNA | <i>Nitrosococcus mobilis</i>                                    | Pommerening-Röser et al. 1996 |
| CTO189f C-GC    | 16S rRNA | βAOB  | Kowalchuk et al. 1997         |
| Nso 190         | 16S rRNA | βAOB  | Kowalchuk et al. 1997         |
| Noli191         | 16S rRNA | βAOB  | Mobarry et al. 1996           |
| TAOfwd          | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas</i> cluster 6a                                  | Gieseke et al. 2001           |
| NM198           | 16S rRNA | Terrestrial AOB   | Chandler et al. 1997          |
| NmoCL6a_205     | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas urea</i> <i>Nitrosomonas</i> sp. AL212          | Suwa et al. 1997              |
| Nml             | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas</i> cluster 6a                                  | Stephen et al. 1998           |
| Nmo218          | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas europaea</i> -lineage                           | Pommerening-Röser et al. 1996 |
| TMP1            | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas oligotropha</i> -lineage                        | Gieseke et al. 2001           |
| β-AO233         | 16S rRNA | AOB   | Hermansson & Lindgren 2001    |
| NspCL1_249      | 16S rRNA | βAOB  | Stephen et al. 1998           |
| Nmo254a         | 16S rRNA | <i>Nitrosospira</i> cluster 1                                   | Stephen et al. 1998           |
| Nmo254          | 16S rRNA | All <i>Nitrosomonas</i>   | Stephen et al. 1998           |
| RT1r            | 16S rRNA | All <i>Nitrosomonas</i>   | Stephen et al. 1998           |
| AAO258          | 16S rRNA | AOB   | Hermansson & Lindgren 2001    |
| Primer 356f     | 16S rRNA | Terrestrial βAOB  | Hiorns et al.1995             |
| NmoCL6b_376     | 16S rRNA | Nested PCR in NitAB amplicons                                   | Hollibaugh et al. 2002        |
| Nsp436          | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas</i> cluster 6b                                  | Stephen et al. 1998           |
| NmoCL7_439      | 16S rRNA | All <i>Nitrosospira</i>   | Stephen et al. 1998           |
| Nm439           | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas</i> cluster 7                                   | Stephen et al. 1998           |
| NitD            | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas urea</i> <i>Nitrosomonas</i> sp. AL212          | Suwa et al. 1997              |
| NMOB1f          | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas europaea</i>                                    | Ward et al. 1997              |
| NSMR52f         | 16S rRNA | <i>Nitrosococcus mobilis</i> -like AOB                          | Burrell et al. 2001           |
| Nsv 443         | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas europaea</i> -like AOB                          | Burrell et al. 2001           |
| NspCL4_446      | 16S rRNA | <i>Nitrosospira</i> spp.  | Mobarry et al. 1996           |
| Nsp0            | 16S rRNA | <i>Nitrosospira</i> cluster 4                                   | Stephen et al. 1998           |
| NspCL3_454      | 16S rRNA | <i>Nitrosospira</i> spp.  | Pommerening-Röser et al. 1996 |
| NspCL2_458      | 16S rRNA | <i>Nitrosospira</i> cluster 3                                   | Stephen et al. 1998           |
| Nlm 459r        | 16S rRNA | <i>Nitrosospira</i> cluster 2                                   | Stephen et al. 1998           |
| NSM1B           | 16S rRNA | <i>Nitrosospira multififormis</i> <i>Nitrosospira</i> sp. C-141 | Hastings et al. 1997          |
| Primer 517r     | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas europaea</i> -lineage                           | Hovanec & DeLong 1996         |
| TAOrev          | 16S rRNA | <i>Nitrosococcus mobilis</i>                                    | Hollibaugh et al. 2002        |
| CTO654r         | 16S rRNA | Nested PCR in NitAB amplicons                                   | Chandler et al. 1997          |
| NITROSO4E       | 16S rRNA | Terrestrial ammonia oxidizers                                   | Kowalchuk et al. 1997         |
| NEU             | 16S rRNA | βAOB  | Hovanec & DeLong 1996         |
| Amβ             | 16S rRNA | βAOB  | Wagner et al. 1995            |
| NitF            | 16S rRNA | βAOB  | Utaaker & Nes 1998            |
| NitC            | 16S rRNA | βAOB  | Ward et al. 1997              |
| NmIII           | 16S rRNA | βAOB  | Voytek & Ward 1995            |
| NSMR53r         | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas marina</i> -lineage                             | Pommerening-Röser et al. 1996 |
| NSMR74r         | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas europaea</i> -like AOB                          | Burrell et al. 2001           |
| NMOB1r          | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas marina</i> -like AOB                            | Burrell et al. 2001           |
| NSMR33r         | 16S rRNA | <i>Nitrosococcus mobilis</i> -like AOB                          | Burrell et al. 2001           |
| RNM-1007        | 16S rRNA | <i>Nitrosospira tenuis</i> -like AOB                            | Burrell et al. 2001           |
| NS-1009         | 16S rRNA | Terrestrial <i>Nitrosomonas</i> spp.                            | Hiorns et al.1995             |
| NmlV            | 16S rRNA | <i>Nitrosospira</i> spp.  | Hiorns et al.1995             |
| NitB            | 16S rRNA | <i>Nitrosomonas cryotolerans</i> -lineage                       | Pommerening-Röser et al. 1996 |
| Nso 1225        | 16S rRNA | βAOB  | Voytek & Ward 1995            |
| βAMOr           | 16S rRNA | βAOB  | Mobarry et al. 1996           |
| Nse 1472        | 16S rRNA | βAOB  | McCaig et al. 1994            |
| AMO-f           | amoA     | <i>Nitrosomonas europaea</i> -lineage                           | Juretschko et al. 1998        |
| AMO-r           | amoA     | <i>Nitrosomonas</i> / <i>Nitrosococcus</i>                      | Sinigalliano et al. 1995      |
| amoA-1F         | amoA     | <i>Nitrosomonas</i> / <i>Nitrosococcus</i>                      | Sinigalliano et al. 1995      |
| amoA-2R         | amoA     | βAOB  | Rotthauwe et al. 1997         |
|                 | amoA     | βAOB  | Rotthauwe et al. 1997         |

## 2.3.2 亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB)

### (1) NOB の系統分類

既知の NOB は, *Nitrobacter* 属, *Nitrococcus* 属, *Nitrospina* 属, *Nitrospira* 属の 4 つのグループに分類される (Koops et al. 2001)。これらの属名は, AOB の場合と同様にその細胞の外形態と構造の特徴によって付けられた (Prosser 1989)。

NOB の中でもっとも多く研究がなされている *Nitrobacter* 属は Alphaproteobacteria ( $\alpha$ -proteobacteria) に分類され, 4 つの種 *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter vulgaris*, *Nitrobacter alkalicus* が記載されている。16S rRNA 塩基配列をもちいた解析から, これらの *Nitrobacter* 種は非常に近接したクラスターを形成することが知られている。Orso et al. (1994) らによる *Nitrobacter* 属の 16S rRNA の全塩基配列を用いた系統解析によると, 各 *Nitrobacter* 種の平均的な相同性は 99.2% であった。また, 亜硝酸酸化能を持たない *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter palustris*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Blastobacter denitrificans*, *Afipia felis*, *Afipia clevelandensis*, などとも近接していることが知られている (Teske et al. 1994)。

*Nitrococcus* 属は Gammaproteobacteria ( $\gamma$ -proteobacteria) に, *Nitrospina* 属は Deltaproteobacteria ( $\delta$ -proteobacteria) にそれぞれ分類され, この 2 属の単離株である *Nitrococcus mobilis* と *Nitrospina gracilis* は海洋にその存在が確認されている。*Nitrospira* 属は門レベルで他の NOB 種と異なるとされており, 二つの種 *Nitrospira marina* と *Nitrospira moscoviensis* が知られている。

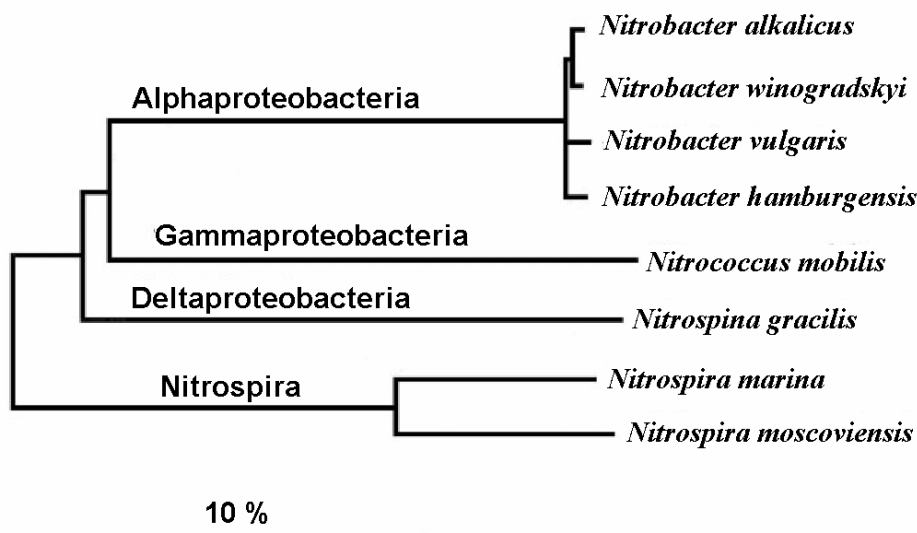


Fig. 2-8 16S rRNA 塩基配列に基づいた NOB の系統関 (Koops & Pommerening-Röser 2001 を一部改変)

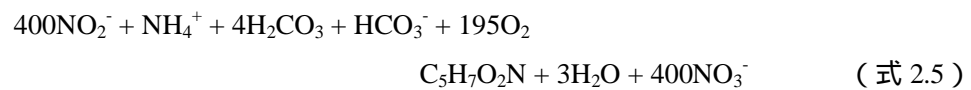
## (2) NOB の生理学的

NOB は独立栄養（化学無機独立栄養）細菌であり，亜硝酸を電子供与体，酸素を電子受容体として利用した亜硝酸酸化を行う。この反応には NOB が有する酵素 nitrite oxidoreductase（亜硝酸酸化還元酵素; NOR）に触媒される（式 2.4）。

NOR（nitrite oxidoreductase）による亜硝酸酸化



この反応で生成されるエネルギーを利用し，炭酸ガスを固定して増殖を行う（式 2.5）。



## (3) NOB の分子生物学的研究

一般に自然環境では亜硝酸酸化反応の速度がアンモニア酸化反応の速度を上回り，アンモニア酸化反応が硝化反応の律速因子となるため，NOB よりも AOB の研究が重視されてきた。また，NOB は 4 つもの属にまたがって存在しているため，その解析を効率よく行うための分子生物学的ツール（PCR primer, FISH probe, etc.）の設計も容易ではない。よって，AOB に比べ NOB の解析手法は充実とは程遠い状況にある。

Table 2-2 に NOB を標的とした既存の PCR primer と FISH probe をまとめた。

Table 2-2 NOB に特異的な既存の primer および probe (本表に記載した文献の中には巻末の引用文献一覧に掲載していないものも含まれる)

| Primer or Probe | Target      | Specificity   | Ref.                   |
|-----------------|-------------|---|------------------------|
| FGPS872f        | 16S rRNA    | genus <i>Nitrobacter</i>  | Degrange & Bardin 1995 |
| FGPS1269r       | 16S rRNA    | genus <i>Nitrobacter</i>  | Degrange & Bardin 1995 |
| FGPI149-457     | 16S rRNA    | genus <i>Nitrobacter</i> ITS  | Gradmann et al. 2000   |
| FGPL420'-458    | 16S rRNA    | genus <i>Nitrobacter</i> ITS  | Gradmann et al. 2000   |
| NSR1113f        | 16S rRNA    | genus <i>Nitrospira</i>   | Dionisi et al. 2002    |
| NSR1264r        | 16S rRNA    | genus <i>Nitrospira</i>   | Dionisi et al. 2002    |
| norB269f        | <i>norB</i> | <i>Nitrobacter hamburgensis</i>   | 赤司 2004                |
| norB443r        | <i>norB</i> | <i>Nitrobacter hamburgensis</i>   | 赤司 2004                |
| NB1000          | 16S rRNA    | <i>Nitrobacter</i> spp.   | Mobarry et al. 1996    |
| NIT3            | 16S rRNA    | <i>Nitrobacter</i> spp.   | Wagner et al. 1996     |
| NSR1156         | 16S rRNA    | <i>Nitrospira moscoviensis</i> ,<br>freshwater <i>Nitrospira</i> spp.               | Schramm et al. 1998    |
| NSR447          | 16S rRNA    | <i>Nitrospira</i> spp.  | Schramm et al. 1998    |
| NSR826          | 16S rRNA    | <i>Nitrospira moscoviensis</i> ,<br>freshwater <i>Nitrospira</i> spp.               | Schramm et al. 1998    |
| Ntspa1026       | 16S rRNA    | <i>Nitrospira moscoviensis</i> , activated<br>sludge clones A4 and A11              | Juretschko et al. 1998 |
| Ntspa454        | 16S rRNA    | <i>Nitrospira moscoviensis</i> 710-9<br>clone                                       | Hovanec et al. 1998    |
| Ntspa662        | 16S rRNA    | genus <i>Nitrospira</i>   | Daims et al. 2001      |
| Ntspa685        | 16S rRNA    | <i>Nitrospira moscoviensis</i> , <i>Nitrospira</i><br><i>marina</i> and 710-9 clone | Hovanec et al. 1998    |
| Ntspa712        | 16S rRNA    | most members of the phylum<br><i>Nitrospira</i>                                     | Daims et al. 2001      |
| NTAPA714        | 16S rRNA    | Phylum <i>Nitrospira</i> , not<br><i>Thermodesulfobacterium islandicus</i>          | Loy et al. 2002        |
| Ntspn693        | 16S rRNA    | <i>Nitrospina gracilis</i>  | Juretschko 2000        |
| Ntspn994        | 16S rRNA    | <i>Nitrospina gracilis</i>  | Juretschko 2000        |
| Ntcoc84         | 16S rRNA    | <i>Nitrococcus mobilis</i>  | Juretschko 2000        |
| Ntcoc206        | 16S rRNA    | <i>Nitrococcus mobilis</i>  | Juretschko 2000        |



## 2.4 亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification)

本研究がその主題とした亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification) は、端的に言えば、アンモニア酸化細菌 (AOB) の活性が維持された状態で亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活性が選択的に抑制されたときに起こる。亜硝酸型硝化反応による環境中への亜硝酸の蓄積は、AOB によるアンモニア酸化速度が NOB による亜硝酸酸化速度を上回るわずかなギャップで起こる (Smith et al. 1997b)。このわずかなギャップをいかに作り出すかが、亜硝酸型硝化反応の人為的な制御の要となる。

亜硝酸型硝化反応制御に関する一般的な研究報告はおおよそ、pH、遊離アンモニア ( $\text{NH}_3$ )、溶存酸素 (DO)、温度、塩濃度などの環境要因制御による NOB の選択的抑制に関するものがほとんどである。以下に、これらの環境要因と亜硝酸型硝化反応についての知見を整理する。

### 2.4.1 pH

代表的な AOB である *Nitrosomonas* の至適 pH は 8-9 の間であり、代表的な NOB である *Nitrobacter* の至適 pH は 7 弱というのが一般的な見識である (北尾高嶺, 2003)。Hutton et al., (1975) は 16 - 21 °C, pH 7.8 - 8.4, SRT 30 日, に制御された硝化槽で亜硝酸の蓄積を観察し, Surmacz-Gorska et al. (1997) も排水の pH が NOB の阻害要因になることを述べた。Glass & Silverstein (1998) は、連続回分式リアクター中の汚泥混合液の pH の上昇 (7.5, 8.5, 9.0) とともに亜硝酸態窒素が系内に蓄積 (250, 500, 900 mg  $\text{NO}_2^-$ -N  $\text{L}^{-1}$ ) したことを報告した。一方で Venterea & Rolston (2000b) はカリフォルニアの畑土壌において一定以下の pH 条件下で、一時的な亜硝酸蓄積を観察した。

このように pH 制御による亜硝酸蓄積を観察した文献は複数あるが、pH 制御による亜硝酸蓄積は長期間継続し得ないものであるという報告 (Ruiz et al., 2003) もある。加えて、過剰な pH 制御を行うと AOB 活性が阻害されてしまうことを報告した研究もある。Ruiz et al. (2003) は pH 6.45-8.95 でアンモニア態窒素の硝酸態窒素までの完全な硝化を観察し、その範囲外の pH ではアンモニアの酸化が起こらない、という結果を得た。

### 2.4.2 遊離アンモニア (Free ammonia; FA; $\text{NH}_3$ )

高い pH は環境中に高濃度の遊離アンモニア (Free ammonia; FA;  $\text{NH}_3$ ) が存在することを示唆するものであり、FA 濃度こそが亜硝酸型硝化反応を引き起こす要因になると記述した報告も少なくない。FA は AOB・NOB 両方の生育を阻害するが、NOB のほうがより FA に対する感受性が高いことがいわれている。FA は NOB が有する亜硝酸酸化還元酵素 (nitrite oxidoreductase) の活性を阻害する (Yang & Alleman 1992)。Anthonisen et al. (1976) は NOB 活性を阻害するような FA 濃度は 1.0 mg  $\text{L}^{-1}$  以上であるとした。また、Mauret et al. (1996) は混合培養系における実験から NOB を阻害する FA 濃度の閾値は 6.6-8.9 mg  $\text{NH}_3$ -N  $\text{L}^{-1}$  であ

ると報告した。Bae et al. (2001) は pH 8 (30 , DO=1.5mgL<sup>-1</sup>) で , Jianlong & Ning (2004) は , pH 7.5 (30 , DO=1.5mgL<sup>-1</sup>) で効率的に亜硝酸蓄積を実現できる FA 濃度が得られたとしている。

FA 濃度の NOB に対する影響は , バルク環境あたりの濃度ではなく , NOB バイオマスあたりの濃度によって決まるとを主張した報告があり (Suthersan & Ganczarczyk 1986, Rols et al. 1994, Villaverde et al. 2000) , Rols et al. (1994) は閾値を 0.5-0.3 mg NH<sub>3</sub>-N (mg viable NOB)<sup>-1</sup> と結論した。

しかし , FA の NOB 阻害効果による亜硝酸型硝化反応は一時的なものであるとする報告もある。Suthersan & Ganczarczyk (1986) や Turk & Mavinic (1989) は , AOB も NOB も FA の阻害に徐々に耐性を持つようになるとした。Turk & Mavinic (1989) AOB・NOB とともに , 40 mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> もの FA に耐えられることを示唆した。

#### 2.4.3 溶存酸素

硝化という , 酸素を多量に消費する反応を考えると , 環境中の酸素濃度がその重要な因子になることは容易に想像できる。NOB は AOB に比べ低い酸素親和性を示すことが知られている (Stenstrom & Poduska 1980, Jayamohan et al. 1988, Wiesmann 1994, Sanchez et al. 2001) 。 Tonkovic (1998) は実験室規模リアクターを用いた実験から , 亜硝酸型硝化反応は pH には因らず , むしろ溶存酸素濃度に影響されるとした。実際に , 溶存酸素濃度が減少すると硝化速度もそれに対応して遅くなる (Stenstrom & Poduska, 1980) ことや , 亜硝酸酸化活性のほうがアンモニア酸化活性よりも溶存酸素濃度の影響を強く受ける (Hanaki et al., 1990ab , Dangcong et al., 2000) ことが知られている。

また , NOB は間欠的な嫌気条件への順応性に乏しく , 嫌気-好気サイクルの導入によりその活性が阻害されることがいわれている (Van Loosdrecht & Jetten, 1998, Mota et al., 2005) 。

#### 2.4.4 温度

Partial nitrification-anammox process の先駆けであるデルフト工科大学が提唱した SHARON Process ( 温度を 26 以上に制御することで亜硝酸蓄積を実現 ) に関する報告を始めとして , 亜硝酸蓄積を実現するためにリアクター内の温度を高く維持することの有効性について触れた文献は多数あり , 亜硝酸蓄積に適した温度として 30 を提唱する文献 (Bae et al., 2002, Jianlong & Ning, 2004) もある。

#### 2.4.5 塩濃度

塩濃度が亜硝酸型硝化反応に与える影響について指摘した報告がある。Sanchez et al. (2004) は硝化リアクターにおいて , 60 g NaCl L<sup>-1</sup> で亜硝酸の蓄積傾向を観察した。Chen et al. (2003, 2004) は硝化リアクターにおいて 10000 mg Cl<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> 以上の塩濃度で亜硝酸の蓄積を観察している。

しかし一方で硝化反応（アンモニア酸化反応自体）へ影響する塩濃度の閾値を  $20\text{g Cl}^{-}\text{L}^{-1}$  以上とする報告もあり（Dahl et al. 1997, Dinçer & Kargi 1999），亜硝酸型硝化反応に最適な塩濃度の統一見解は得られていないようである。

## **2.5 新日本製鐵(株)安水処理硝化脱窒試験プラントにおける亜硝酸型硝化反応**

第1章 1.1 でも述べたように，新日本製鐵（株）において過去に運転された，製鐵過程で排出される高濃度のアンモニア等の窒素成分やフェノール類，チオシアン，チオ硫酸，タール状油分などを含む「安水」の硝化脱窒処理試験プラントにおいて安定的な亜硝酸型硝化反応が観察された。本研究の動機はこの試験プラントにおける亜硝酸型硝化反応にあった。以下に新日本製鐵（株）試験プラントの概要と，その亜硝酸型硝化反応の特徴について述べる。

### **2.5.1 新日本製鐵(株)試験プラント(ミニプラント)の概要**

2002 年 8 月，新日本製鐵（株）先端技術研究所（千葉県君津市）において製鐵所コークス炉からの排水である安水を硝化脱窒法で処理する試験プラント（以降「ミニプラント」とする）が立ち上げられ，2003 年 9 月まで運転された（新田見 2003, 高崎 2004）。安水は，アンモニア，フェノール類，シアン，硫化水素，油分など含む排水である。安水処理の中核となるプロセスは活性汚泥法であるが，その成分のために活性汚泥微生物群集の代謝機能の阻害が起こりやすく，活性汚泥法による処理に先立つ前処理が必要となる。従来製鐵所では，凝集沈殿による脱油工程とアンモニアストリッピング法による脱窒工程により，過剰な油分，シアン，硫化水素，アンモニアを除去していたが，アンモニアストリッピング法によるアンモニア除去はコストがかかるという問題がある。そこで安水処理に硝化脱窒法を適用し，生物学的にアンモニアを除去する研究が行われるようになった。新日本製鐵（株）における試験プラントはその流れを汲んだ研究目的のために立ち上げられた。

Fig. 2-9 にミニプラントのフロー図を示した。ミニプラントに流入させた排水は人工的に合成した排水（人工安水，Table 2-3）であった。人工安水は希釈槽において海水により 2.5 倍に希釈され，標準的な硝化液循環式硝化脱窒プロセスにより処理された。水温は 25-30 に管理され，SRT は 50 日程度（2003 年 4 月からは 30 日程度）に管理され，プラント内の MLSS は一定に保たれた。HRT は脱窒槽で 18 時間，硝化槽で 54 時間であった。

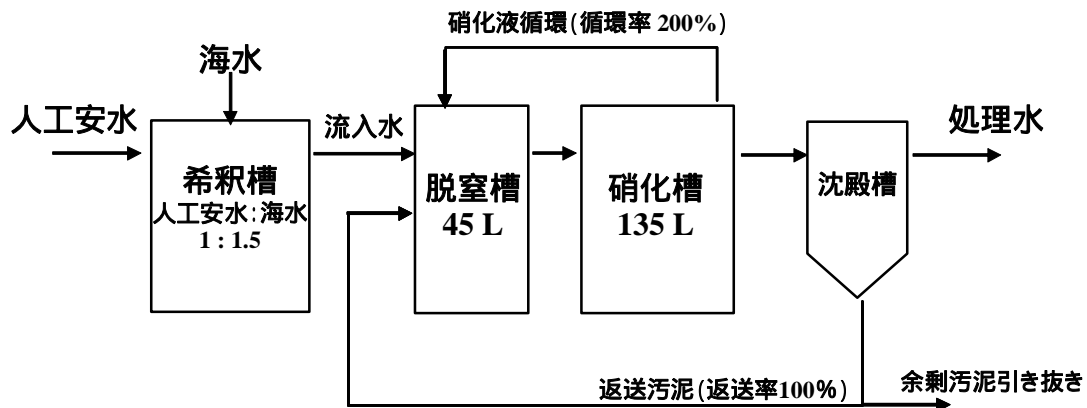


Fig. 2-9 新日本製鐵(株)試験プラント(ミニプラント)処理フロー  
(新田見 2003, 高崎 2004 をもとに作成)

Table 2-3 人工安水の基本的な組成(高崎, 2004)

| pH  | 安水 <sup>a</sup> | NH <sup>4+</sup> -N | Phenol | チオシアン<br>SCN <sup>-</sup> | チオ硫酸<br>S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup> | NaHCO <sub>3</sub> <sup>b</sup> | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>12H <sub>2</sub> O |
|-----|-----------------|---------------------|--------|---------------------------|--|---------------------------------|--|
| 8.3 | 5%              | 500                 | 600    | 100                       | 300  | 1800-5000                       | 51   |

a: 非人工安水を容積で5%のみ添加した。

b: 途中アルカリ度を上げるため、添加量を何回か変更した。

Fig. 2-10 に新日本製鐵(株)ミニプラントの処理成績を示した。ミニプラントでは運転開始当初から安定的な亜硝酸型硝化反応が観察された。Run 5 において、Table 2-3 に示した人工安水からチオ硫酸(S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>)を除いたところ、硝化反応が完全に進行し、処理水中に硝酸態窒素が蓄積を始めた。Run 6 において人工安水中にチオ硫酸を再び加えたところ、再び亜硝酸型硝化反応が得られ、Run 7 におけるチオ硫酸抜き条件で完全な硝化反応が観察された。

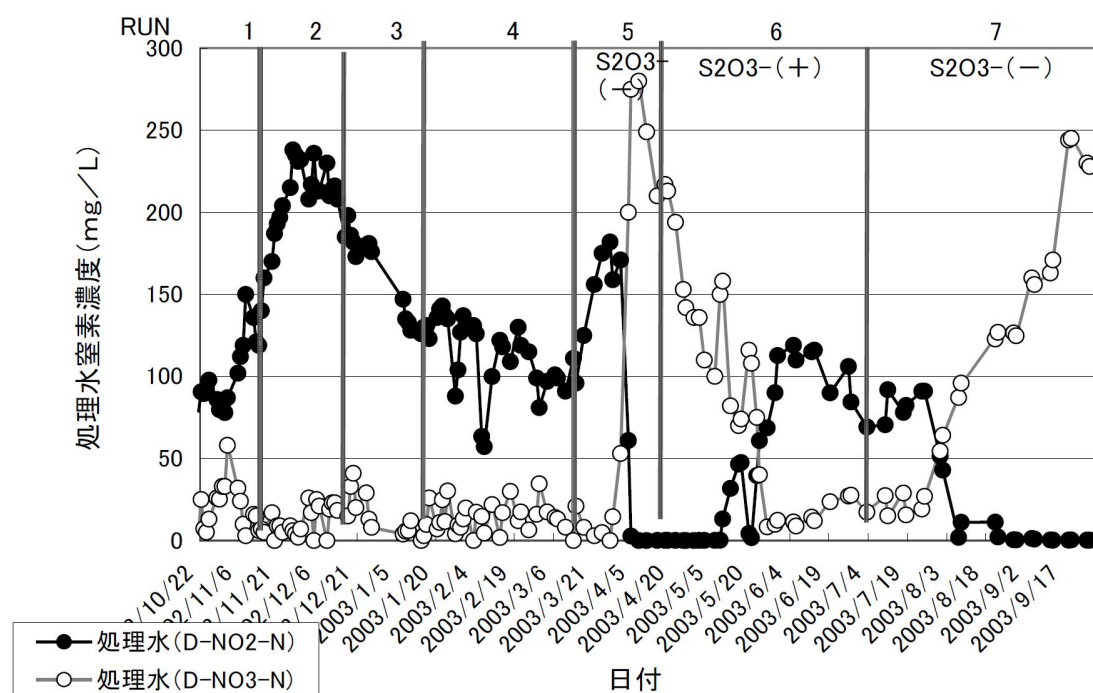


Fig. 2-10 新日本製鐵(株)試験プラント(ミニプラント)処理水中における亜硝酸態窒素( $\text{NO}_2^-$ -N)および硝酸態窒素( $\text{NO}_3^-$ -N)濃度(高崎 2004)

Fig. 2-10 にあらわした結果は、人工安水中のチオ硫酸が亜硝酸型硝化反応に何らかのかたちで寄与していることを示唆するものであった。排水処理の分野において、チオ硫酸による亜硝酸型硝化反応制御について検討したものは皆無に等しい状況の中、この結果は大変興味深いものであった。

### 2.5.3 チオ硫酸と亜硝酸型硝化反応

チオ硫酸が硝化に及ぼす影響についての既存の研究は、排水処理の分野よりもむしろ農業の分野において多い。農業では、窒素肥料( $\text{NH}_4^+$ -N)が施肥後に硝化・脱窒によって失われることを防ぐために硝化抑制剤を用いることがあり、硝化抑制剤としてのチオ硫酸の可能性について論じた報告が複数ある(Goos 1985, Janzen & Bettany 1986, Sallade & Sims 1992, Saad et al. 1996)。これらの多くはアンモニア酸化抑制効果の是非に注目している場合が多く、チオ硫酸の亜硝酸酸化に及ぼす影響について言及していないものもあるが、チオ硫酸の添加による土壤中への亜硝酸態蓄積を観察した報告もある(Janzen & Bettany 1986, Saad et al. 1996)。排水処理分野における研究では、Schreiber & Pavlostathis (1998)がCOD、アンモニア、チオ硫酸が混在する模擬排水を活性汚泥を用いて好気処理した際に亜硝酸型硝化反応が起こったことを示唆する実験結果を示している。

チオ硫酸の生物学的酸化過程においてテトラチオネート(Tetrathionate;  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ )が生成されるが(Suzuki 1999)、Janzen & Bettany (1986)がテトラチオネートこそが硝化抑制に関わっていることを示唆した。

## 2.6 分子生物学的手法を用いた環境微生物群集解析

---

古典的な微生物学による環境微生物群集の解析（検出・定量）は，基本的に培養法によって成り立っていた。培養法は，微生物の生理学・生化学的性質を議論するうえで欠かせない手段となるため今日でも用いられる手法ではあるが，自然界には培養の困難な微生物も多く存在すること，複合系微生物系にはおいてすべての微生物に適した培養条件を設定することが不可能なことが指摘されているように，培養法による環境微生物の解析には限界がある。

1980 年代，分子生物学の発展とともに，環境中に存在する微生物由来の DNA や RNA に注目した解析手法が提案されるようになり，それまでとらえることの難しかった培養困難な微生物を検出・解析できるようになり，環境微生物学は飛躍的な発展を遂げてきた。

本節では，本研究で用いた手法を中心に，分子生物学的手法による環境微生物解析法について概説する。

### 2.61 環境からの DNA の抽出

DNA 抽出は，分子生物学的手法の中でも最も基本的な操作である。DNA の抽出方法には，フェノールクロロホルム法，ベンジルクロライド法，各種 DNA 抽出キットによる方法などがあるが，ここでは本研究で使用した FastDNA® SPIN Kit for Soil（Qbiogene，現 MP Biomedicals）による抽出原理を解説する。

FastDNA® SPIN Kit for Soil は 500mg までの土壌や活性汚泥などの環境サンプルから短時間で効率よく DNA を回収できるキットとして広く用いられている。本法では，専用のホモジナイズ装置が必要であるが，フェノールやクロロホルムなどの有機溶剤が不要であり，比較的抽出が難しいとされているグラム陽性細菌の DNA の回収も可能である。

本法は大きく 2 つの操作からなる。

細胞の破碎・DNA の可溶化・タンパク質の可溶化

サンプルをホモジナイズとタンパク質の可溶化が可能なバッファーに溶解させ，それをセラミックとシリカからなるビーズと混合・高速振とうすることにより，細胞を破碎し DNA を可溶化させる。

DNA の精製と濃縮

可溶化した DNA のみをシリカ製の Binding Matrix に吸着させ，不要なタンパク質などを除去し，精製 DNA を得る。

## 2.6.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR (Polymerase Chain Reaction) は微量な DNA の特定領域を、各種解析手法による検出可能な濃度にまで増幅する手法であり、今日の遺伝子工学の発展に大きく寄与した。PCR の技術にはさまざまな変法が存在するが、ここでは最も基本的な PCR の原理を紹介する。

PCR は三段階の DNA の合成反応によって DNA を増幅する手法である。

増幅元となる DNA (鋳型, テンプレート) 2 本鎖を加熱し、変性 (解離) させ、一本鎖にする (denaturation)。

温度を下げ、増幅させたい特定部位の両端の DNA 塩基配列に相補的なオリゴヌクレオチド短鎖 (プライマー, primer) とテンプレートを結合させる (annealing)。

DNA 合成酵素 (DNA polymerase) と DNA 合成基質 (dNTP) により、の状態でプライマー結合部位から不足分の DNA が合成され、標的にした DNA の完全な 2 本鎖が得られる (extension)。

- の工程を 1 サイクルとし、これを  $n$  回繰り返すことにより、1 つのテンプレート DNA 鎖から  $2^n$  の DNA 鎖を得ることができる。

## 2.6.3 Cloning

複合微生物系から、単一の DNA を抽出する方法のひとつに Cloning がある。Cloning によって単離された DNA の塩基配列を読むことによって、複合微生物系から得られた DNA の集合体が、どのような塩基配列種によって成り立っているのかを解析することができる。本法は、環境微生物の DNA 配列情報の獲得に大きな貢献を果たしている。

Fig. にクローニングの手順を示した。PCR 産物などの DNA 集合体 (インサート群) を、ベクターと呼ばれる環状 DNA 群と反応させ (ライゲーション)、そのベクターを大腸菌などに感染 (トランスフォーメーション) させることで、大腸菌の増殖とともにベクターおよび組み込まれた DNA が増幅できる。原理的に、1 つのベクターには 1 つの DNA 鎖 (インサート) が、1 つの大腸菌には 1 つのベクターが組み込まれるので、培養された大腸菌のコロニー一つひとつが別のインサートを持つことになる。

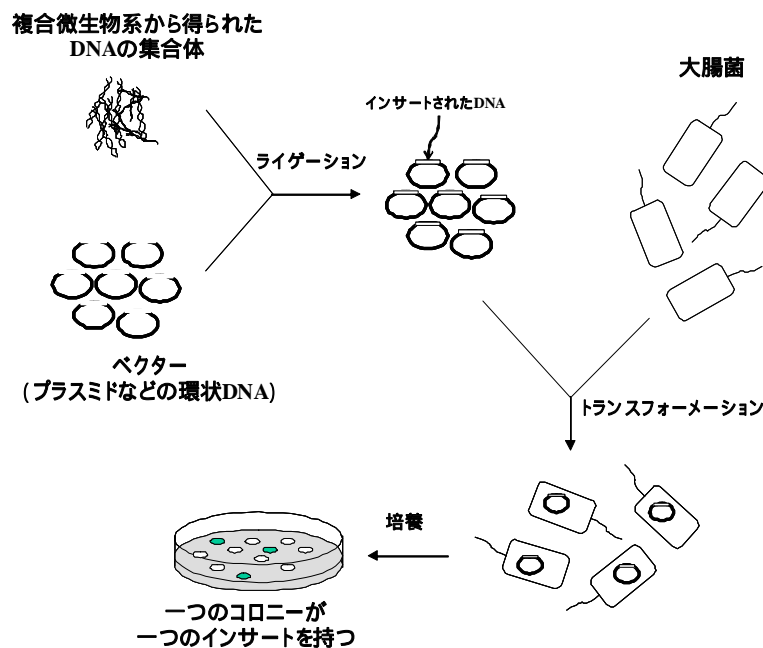


Fig. 2-11 Cloning の流れ

## 2.6.4 Real-time PCR

Real-time PCR は、PCR 増幅産物濃度は初期テンプレート濃度に依存するという原理を利用して、増幅産物濃度から初期テンプレート濃度を求める定量的 PCR の一手法である。

Real-time PCR による DNA 定量には、サーマルサイクラー (Thermocycler) と分光蛍光光度計を一体化した機器を用い、PCR での増幅産物の精製の過程をリアルタイムで検出し、解析する方法である。増幅産物の生成の過程を追跡することが出来るため、より正確な定量が期待出来る。また、解離曲線分析を行う事により、目的産物のみが増幅されたことが確認できる。以下に Real-time PCR の原理と、本研究で用いた Real-time PCR の一手法である QPrimer-PCR 法について解説する。

### ( 1 ) Real-time PCR の原理

定量したい核酸について希釈系列 (検量線作成用の標準サンプル) を作り、それぞれについて PCR を行い、そのタイムコースをリアルタイムで取る。増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数 (threshold cycle; Ct 値) を縦軸、核酸量を横軸にプロットし、検量線を作成する。目的の試料についても同じ条件で PCR を行い、Ct 値を求める事により、検量線から試料中の目的産物の量を測定することができる。

核酸の検出には様々な方法があるが、主流となっているのは蛍光を用いたものである。蛍光は SYBER Green や FRET (fluorescence resonance energy transfer) を用いたハイブリダイゼーションプローブ等がある。現在のリアルタイムの主流となっているのは FRET を利用した TaqMan プローブ (PE Biosystems 社) である。この TaqMan プローブ法は、目的



の増幅産物のみ測定できるため正確な定量が可能であるという利点がある。一方，目的産物に応じたプローブをデザインし，合成する必要がある点や，増幅サイズが 80～150bp，長くても 300bp のものしか利用できないという欠点がある。それに対して，Kurata らにより開発された QPrimer-PCR 法は増幅サイズの制限が低くなり( 900bp ぐらいまで可能 )，また，新たにプローブを作成せずとも，既存のプライマーに蛍光色素をつけるだけで利用できるというメリットがある。本研究では，この QPrimer-PCR 法を用いた。

以下に Real-time PCR の長所・短所についてまとめた。

長所 ・微量遺伝子でも強力な検出力を持つ。

- ・一度に大量のサンプルを処理できる
- ・短時間 ( 2 ～ 4 時間 ) で反応が行える
- ・準備が簡便であり，ルーチンなモニタリングには最適
- ・測定後のアガロースゲルチェックが不要

短所 ・非特異的産物の増幅

最初はわずかなコンタミネーションであっても，PCR の過程で大量に増幅されて致命的失敗を招いてしまう。

- ・プライマーのデザイン，温度条件などの最適化に時間がかかる

今までに PCR を行ったことのない領域の遺伝子を増幅しようとする場合には，プライマーデザインからはじめる必要がある。非特異的産物の生成およびプライマーダイマー ( プライマー同士が結合すること。これができるとう目的産物を上回って増幅されてしまう ) のできない箇所を捜し当てるのが非常に困難である。また，温度条件やプライマー濃度等を最適化するのにも多くの時間が費やされる。また，普通の PCR 法に比べて感度が高く，普通の PCR 法に用いる場合には問題なく増幅されるにも関わらず，リアルタイム PCR ではダイマーが確認され適用できない場合がある。

- ・検出機器，ランニングコストが高い

## (2) QPrimer-PCR

QPrimer-PCR( Quenching Primer-PCR )は蛍光消光プライマーを用いる。この手法は、DNA の構成塩基である C (シトシン) にある蛍光色素を付加させておくと、C の相補的な塩基である G (グアニン) が結合したときに G と蛍光色素の相互作用によりその蛍光が消光するという現象を PCR での定量に応用したものである (Kurata et al., 2001)。PCR を行う際に用いるプライマーの末端に蛍光標識した C 塩基を付加しておき (これを Qprimer と呼ぶ)、PCR の伸長反応によって G が Qprimer 末端の C 塩基に結合したときの蛍光消光率をサイクルごとにプロットすることで増幅をリアルタイムに観察することが出来る。

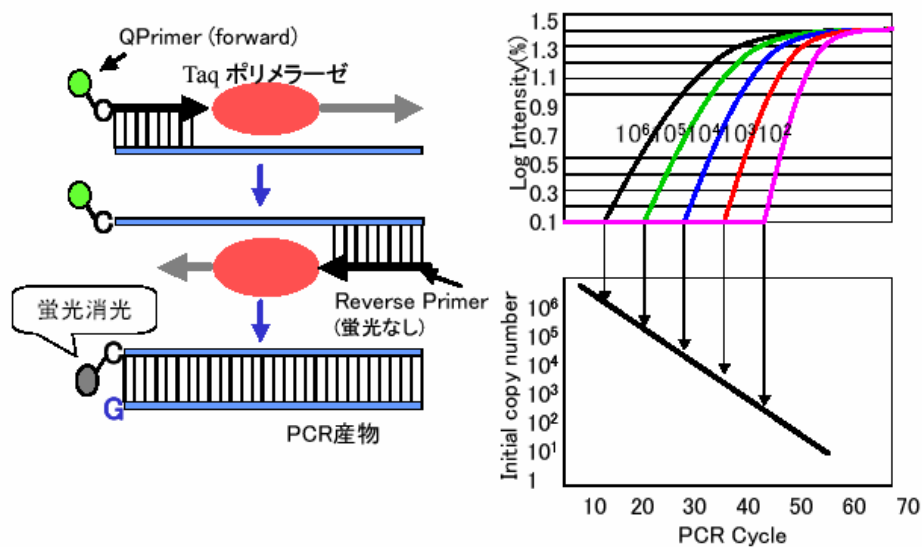


Fig. 2-12 QPrimer-PCR による DNA 量の定量

### 2.6.5 Terminal Restriction Fragment Length (TRFLP)

蛍光標識された DNA 断片の集合体(片方の primer の 5'末端に蛍光標識を付加した primer set を用いた PCR 産物など)を, 特定の塩基配列を認識して DNA 鎖を切断する制限酵素で処理し, 蛍光色素が付加された側の断片長によって, 異なる塩基配列をもつ DNA 同士を分離する手法である。Liu et al. (1997) により環境微生物の群集解析を目的として開発され, AOB 群集解析にも活用されている (Hortz et al. 2000, Sakano et al. 2002)。

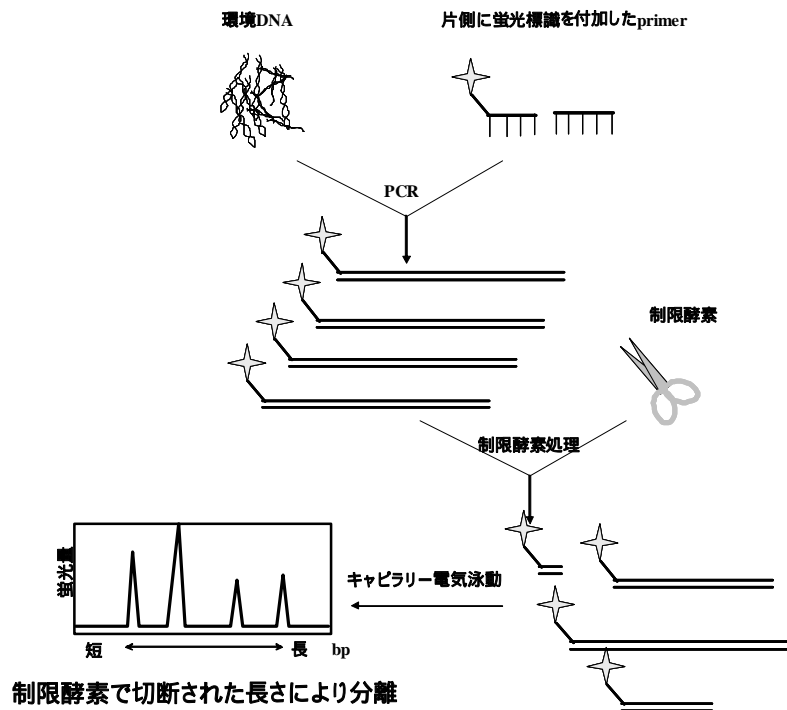


Fig. 2-13 PCR-TRFLP の流れ

### 2.6.6 Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

1980 年代末より開発された手法であり、Amann らにより、この手法が環境微生物分野でも十分適用可能であることが示され、その具体的な実験手法が紹介された (Amann, 1995)。標的塩基配列に相補的な塩基配列 (oligonucleotide probe) を蛍光物質で標識し、細菌内の標的塩基配列と結合 (Hybridize) させ、それを蛍光顕微鏡で観察することにより、目的の細菌を検出、定量する。FISH 法を微生物の検出に用いる場合、rRNA (ribosomal RNA) を標的とする。標的となる rRNA は 1 つの細胞に  $10^3$ - $10^5$  存在しており、結合した probe の蛍光を顕微鏡下で観察することが可能である。

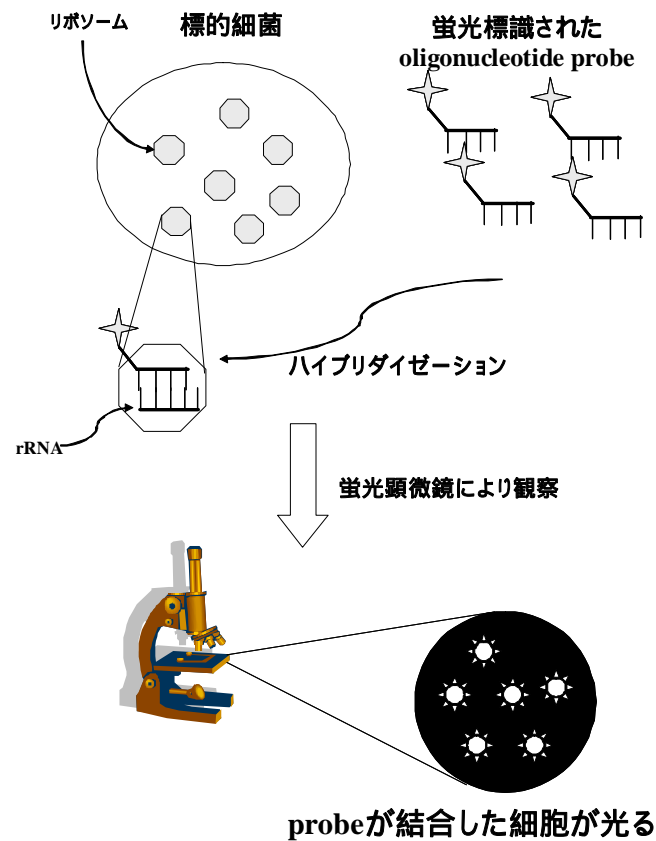


Fig. 2-14 FISH による標的細菌の検出

## 第3章 実験方法

本研究における実験手法の実際を詳説した。

### 3.1 実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築

---

排水を処理する水槽を反応槽，リアクターなどと呼ぶ。本研究を始めるにあたり運転条件等の参考にした新日本製鐵（株）の試験プラント（ミニプラント）では，それぞれが一つの処理工程を担う複数の槽を用いて，排水がそれらの槽を順々に流下することで処理される連続式リアクター（Continuous-Flow Reactor）が用いられたが，本研究で用いたリアクターは一槽式リアクターであり，時間によって処理工程（嫌気工程，好気工程，沈殿工程など）を区切る連続回分式リアクター（Sequencing Batch Reactor; SBR）とよばれるものとした。

連続回分式リアクターは，一定量の合成排水がリアクターに流入すると一つの反応槽の中で各処理工程が行われるため，合成排水が流入してから処理が終わるまで（この一連の過程を「サイクル」と呼ぶ）の物質収支を求めやすい。経時的にリアクター内の水質を分析することで，各処理工程における処理速度も実験的に求めやすくなる。

#### 3.1.1 リアクターのセットアップ

本リアクターセットは，有効容量 5 L の「リアクター本体（一槽式，アクリル製）」と水温制御用の「恒温槽」からなる。「リアクター本体」は，リアクター，各種ポンプ，基質タンク，各種センサ・電極からなり，「恒温槽」は，恒温槽用コンテナ，投げ込みヒータ，水循環ポンプで構成される。リアクターシステム全体の写真を Fig.3-1 に示し，模式図を Fig. 3-2 に示した。また，本リアクターの種汚泥は新日本製鐵（株）先端技術研究所のミニプラントより分与いただいた。

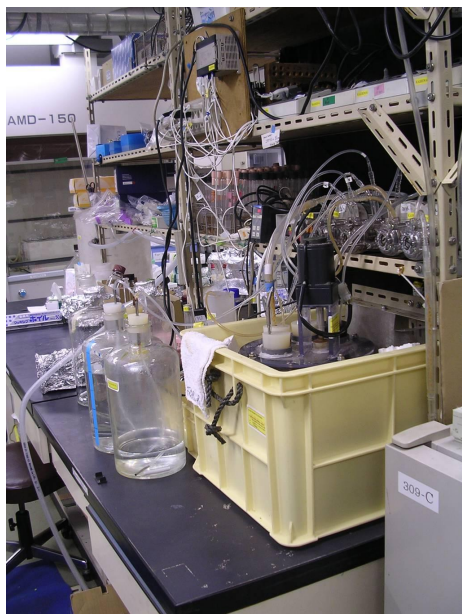


Fig. 3-1 リアクターセット概観

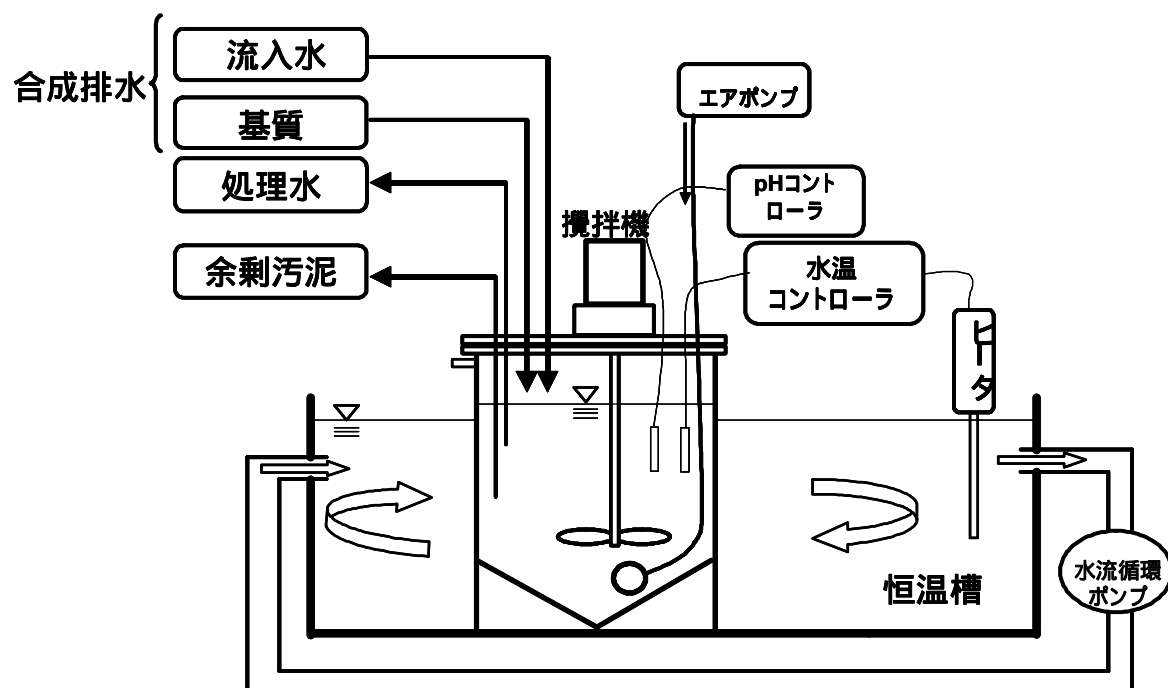


Fig. 3-2 リアクターセット模式図

### 3.1.2 リアクターの運転条件

リアクターの基本運転条件を Table 3-1 に示した。また，リアクター制御に関わる項目について以下に解説する。

#### サイクル制御

連続回分式リアクターにおいて，合成排水が流入し一連の処理工程を経て浄化された処理水が得られるまでの一連の過程を「サイクル」と呼ぶ。サイクル制御には Programmable Controller SYSMAC CPM1A-30CDR-A-V1(オムロン)を使用した。

本リアクターは 1 サイクル 8 時間とし，運転期間中に 2 度サイクルの内訳（各処理工程の時間的配分）を変更した。詳細は第五章に譲るが，Table 3-2 に用いたサイクルを全て示した。

#### 合成排水

合成排水とは，実排水を模倣した有機物や無機物からなる混合液のことを指す。本リアクターで使用した合成排水の組成は新日本製鐵（株）ミニプラントのものを参考にした。参考にしたミニプラントの水質を Table 3-3 に，本研究で使用した合成排水の成分を Table 3-2 に示した。ミニプラントではコークス炉排水の主成分の一つであるフェノールは取り扱い上の困難さから使用せず，グルコースと酢酸で代用した。合成排水の組成は，サイクルの変更に伴って運転期間中に一度変更した。

#### 塩濃度

旧ミニプラントでは実際の海水を用いていたが，本リアクターでは，標準海水と規定されているもの（淵，1970）を参考に，塩化ナトリウム溶液（ $14.0\text{g NaCl L}^{-1}$ ）をもって模擬海水とし，合成排水に混入させた。

Table 3-1 リアクター基本運転条件

|      |  |
|------|--|
| 有効容量 | 5L   |
| 系    | 連続回分式  |
| HRT  | 16時間   |
| SRT  | 20日  |
| 水温   | 30   |
| pH   | 80g NaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> を用いて下限のみ帯 |
| 曝気量  | 3L min. <sup>-1</sup>                            |

Table 3-2 リアクター運転条件履歴

|  |                          |   |                          |  |                          |
|--|--------------------------|---|--------------------------|--|--------------------------|
| A. 運転開始 - 74日目   |                          | B. 75 - 111日目   |                          | C. 112 - 現在  |                          |
| 有効容量 5L  |                          | 有効容量 5L   |                          | 有効容量 5L  |                          |
| 系 連続回分式  |                          | 系 連続回分式   |                          | 系 連続回分式  |                          |
| サイクル   |                          | サイクル  |                          | サイクル   |                          |
|  |                          |   |                          |  |                          |
| HRT 16時間   |                          | HRT 16時間  |                          | HRT 16時間   |                          |
| SRT 20日  |                          | SRT 20日   |                          | SRT 20日  |                          |
| 30   |                          | 30  |                          | 30   |                          |
| pH > 7.2 (80 g NaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> で下限のみ制御) |                          | pH > 7.2 (80 g NaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> で下限のみ制) |                          | pH > 8.0 (80 g NaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> で下限のみ制御) |                          |
| ばっ気 3L min. <sup>-1</sup>                                  |                          | ばっ気 3L min. <sup>-1</sup>                                 |                          | ばっ気 3L min. <sup>-1</sup>                                  |                          |
| 合成廃水   |                          | 合成廃水  |                          | 合成廃水   |                          |
| 基質   | 濃度 [mg L <sup>-1</sup> ] | 基質  | 濃度 [mg L <sup>-1</sup> ] | 基質   | 濃度 [mg L <sup>-1</sup> ] |
| Glucose  | 143                      | Glucose   | 362                      | Glucose  | 362                      |
| CH <sub>3</sub> COONa                                      | 196                      | CH <sub>3</sub> COONa                                     | 565                      | CH <sub>3</sub> COONa                                      | 565                      |
| NaHCO <sub>3</sub>   | 400                      | NaHCO <sub>3</sub>  | 400                      | NaHCO <sub>3</sub>   | 400                      |
| NH <sub>4</sub> Cl   | 600                      | NH <sub>4</sub> Cl  | 600                      | NH <sub>4</sub> Cl   | 600                      |
| CaCl <sub>2</sub>  | 50                       | CaCl <sub>2</sub>   | 50                       | CaCl <sub>2</sub>  | 50                       |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                        | 30                       | MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                       | 30                       | MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                        | 30                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                            | 50                       | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                           | 50                       | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                            | 50                       |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>              | 212                      | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>             | 212                      | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>              | 212                      |
| NaCl   | 14000                    | NaCl  | 14000                    | NaCl   | 14000                    |

Table 3-3 新日本製鐵(株) 旧ミニプラントにおける水質モニタリング結果 (NA: Not analyzed, -: Not detected)

| 4月1日            |                        |                     |      |
|-----------------|------------------------|---------------------|------|
|                 | 亜硝酸型硝化時(5/29-7/25)の平均値 | 完全硝化時(8/7-9/26)の平均値 |      |
| 脱窒槽 - 1         | pH                     | 8.2                 | 8.0  |
|                 | ORP                    | -234                | -167 |
|                 | DO                     | 0.2                 | 0.3  |
|                 | 水 温                    | 29                  | 28   |
| (脱窒槽 - 2)/硝化槽-0 | pH                     | 8.7                 | 8.2  |
|                 | ORP                    | NA                  | NA   |
|                 | DO                     | 2.7                 | 2.1  |
|                 | 水 温                    | 30                  | 30   |
| 硝化槽-1           | pH                     | 7.9                 | 8.0  |
|                 | ORP                    | NA                  | NA   |
|                 | DO                     | 4.0                 | 4.0  |
|                 | 水 温                    | 30                  | 27   |
|                 | 1通気量                   | 10                  | 10   |
| 硝化槽-2           | pH                     | 8.6                 | 8.7  |
|                 | ORP                    | 114                 | 136  |
|                 | DO                     | 4.4                 | 4.3  |
|                 | 水 温                    | 30                  | 30   |
|                 | 2通気量                   | 10                  | 10   |

|                     | 亜硝酸型硝化時(5/29-7/25)の平均値            | 完全硝化時(8/7-9/26)の平均値 |      |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------|------|
| 原水                  | PH                                | 8.1                 | 7.9  |
|                     | SS                                | 224                 | 274  |
|                     | T - N                             | 522                 | 508  |
|                     | D - T - N                         | 505                 | 503  |
|                     | D - NH4 - N                       | 487                 | 468  |
|                     | D - NO2 - N                       | 0.1                 | 0.1  |
|                     | D - NO3 - N                       | 0.4                 | 0.2  |
|                     | COD                               | 1206                | 978  |
|                     | D - COD                           | 1164                | 975  |
|                     | D - TOC                           | 445                 | 460  |
|                     | D - フェノール                         | 624                 | 582  |
|                     | D - SCN                           | -                   | -    |
|                     | D - S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 236                 | -    |
| D - SO <sub>4</sub> | 1534                              | 1401                |      |
| 脱窒槽出口               | PH                                | 8.2                 | 8.0  |
|                     | D - T - N                         | 136                 | 190  |
|                     | D - NH4 - N                       | 116                 | 122  |
|                     | D - NO2 - N                       | 7.1                 | 0.7  |
|                     | D - NO3 - N                       | 1.5                 | 57.0 |
|                     | D - COD                           | 134                 | 21   |
|                     | D - TOC                           | 115                 | 50   |
|                     | D - フェノール                         | 64.2                | 14.7 |
|                     | D - SCN                           | -                   | -    |
|                     | D - S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 47.0                | -    |
|                     | D - SO <sub>4</sub>               | 1960                | 1436 |
|                     | Mアルカリ                             | 1285                | 1239 |
|                     | MLSS                              | 2082                | 2281 |
| MLVSS               | 1227                              | 1644                |      |
| 処理水                 | PH                                | 8.1                 | 8.2  |
|                     | T - N                             | 150                 | 192  |
|                     | D - T - N                         | 135                 | 181  |
|                     | D - NH4 - N                       | 12.0                | 0.2  |
|                     | D - NO2 - N                       | 94.8                | 2.2  |
|                     | D - NO3 - N                       | 18.6                | 163  |
|                     | COD                               | 113                 | 10.7 |
|                     | D - COD                           | 113                 | 9.6  |
|                     | D - TOC                           | 56.9                | 40.5 |
|                     | D - フェノール                         | 0.6                 | 0.1  |
|                     | D - SCN                           | -                   | -    |
|                     | D - S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 5.1                 | -    |
|                     | D - SO <sub>4</sub>               | 2023                | 1452 |



### HRT および SRT の制御

HRT (Hydraulic Retention Time; 水理学的滞留時間) とはすなわち流入した合成排水がリアクター内に滞留する時間であり, SRT (Solid Retention Time; 固形物滞留時間) はリアクター内の固形物=活性汚泥が更新される時間である。

本リアクターでは1サイクルを8時間とし, サイクルごとにリアクターの有効容量(5L)の半分に相当する  $2.5 \text{ L} (7.5 \text{ L day}^{-1})$  の処理水を放流し, 同量の合成排水を流入するように制御した。よって, 一度流入した合成排水が処理水として完全に放流される時間  $\text{HRT} = 5 / 7.5 = 2/3 \text{ day} = 16 \text{ hr}$  に制御された。

SRT は良好な活性汚泥の維持に関わる重要な要因となる。最適な SRT よりも短い SRT を設定すると, 活性汚泥微生物群集の生育速度を汚泥の更新速度が凌駕してしまい, リアクターから活性汚泥が“ウォッシュアウト”されてリアクター内の適度な汚泥濃度が維持できなくなる。本研究では, 生育速度の遅い独立栄養の硝化細菌をターゲットにしたため,  $\text{SRT} = 20$  日と比較的長めに設定した。SRT は, 沈殿工程の直前五分間に 83mL の汚泥混合液をリアクターから引き抜くことで制御した。

### 水温制御

本リアクターでは, 水温コントローラ (FHP-301, 東京硝子器械) による水温の自動調節を行った。リアクター内水温をセンサでモニタリングし, 恒温槽の投げ込みヒータがそれに呼応する仕組みとし (Fig. 3-2), リアクター内水温を  $30^\circ\text{C}$  に保つようにした。

### pH 制御

pH の制御には pH コントローラ (PU-01, SHIBATA) とペリスタルティックポンプ (PERISTA PUMP SJ-1211, ATTO),  $80 \text{ g NaHCO}_3 \text{ L}^{-1}$  溶液を用いた, 下限のみの制御を行った。pH の制御値は, 運転開始時は  $\text{pH} > 7.2$ , 運転開始から 112 日目以降は  $\text{pH} > 8.0$  とした (詳細は第 5 章参照)。

### 曝気量制御

酸素を多量に消費する硝化反応において, リアクターの曝気量は重要な意味を持つ。本リアクターでは, エアポンプ (APN-085V-1, IWAKI) と流量計 (ヒヨシ器械産業) により曝気量の制御を行った。曝気量は  $3 \text{ L min}^{-1}$  とした。

### 3.1.3 リアクターの水質モニタリング

水質モニタリングは、3日 2週間に一度、任意のサイクルにおいて合成排水流入直後から一連の処理工程が終わるまでの間に経時的に採取した汚泥混合液（Mixed liquor）中の溶存物質に対して行った。本研究におけるリアクター水質分析項目を Table 3-4 に示した。

また、リアクターの汚泥濃度を把握するために毎回の水質モニタリング時に MLSS，MLVSS を測定した。

Table 3-4 水質分析項目

| 分析項目      | 分析法           |
|-----------|---------------|
| アンモニウムイオン | インドフェノール法     |
| 亜硝酸イオン    | ナフチルエチレンジアミン法 |
| 硝酸イオン     | イオンクロマトグラフィー  |
| チオ硫酸イオン   | イオンクロマトグラフィー  |
| 硫酸イオン     | イオンクロマトグラフィー  |
| 溶存有機態炭素   | 全有機態炭素計       |

以下に、各モニタリング項目の分析方法を紹介する。

#### a) アンモニウムイオン

アンモニウムイオンはインドフェノール法により定量した。リアクターから採取した汚泥混合液を遠心分離（3500rpm, 3-5min.）し、上澄み液を 0.45 $\mu$ m のメンブレンフィルター（Cellulose acetate）でろ過したものを供試検体とした。以下に分析の詳細を示す。

#### 使用する器具・装置

分光光度計  
2.5 mL 比色管, etc.  
汲んだばかりの超純水

#### 試薬

- ・フェノールアルコール溶液  
プロピルアルコール（1-プロパノール）5 mL にエタノールを加えて全量を 100mL とした液に、フェノール 10g を溶かす。
- ・ニトロプルシッドナトリウム溶液  
ニトロプルシッドナトリウム（ペンタシアノニトリル鉄（Ⅲ）酸ナトリウム）1g を超純水 200mL に溶かし、遮光保存。一ヶ月有効。
- ・アルカリ性クエン酸三ナトリウム溶液  
水酸化ナトリウム 5g を超純水約 350mL に溶かし、クエン酸三ナトリウム 100g（間違いではない。100g）を加えて溶かし、最後に超純水で 500mL にメスアップ。
- ・次亜塩素酸ナトリウム溶液  
次亜塩素酸ナトリウムなら 2-5 倍程度希釈。測定当日に調整。
- ・酸化剤溶液  
アルカリ性クエン酸三ナトリウム溶液：次亜塩素酸ナトリウム溶液 = 4:1 で混合する。測定当日に調整。
- ・アンモニア性窒素標準原液（1000mgN L<sup>-1</sup>）  
塩化アンモニウムを硫酸デシケートで 4 時間以上乾燥させた後、3.82g を正確に量り取り、汲んだばかりの超純水に溶かして 1 L に定容。

#### 検量線の作成

- (1) アンモニア性窒素標準原液から 0 - 0.8mgN/L の範囲で 5 段階以上の標準液を、各 10mL ずつ、25mL 比色管内に作成した。
- (2) 試料と同様に発色させ、アンモニア性窒素濃度と吸光度の関係から、検量線を作成する。

#### 測定

- (1) 25mL 比色管に、適当に希釈した試料を 10mL とる。
- (2) フェノールアルコール溶液 0.4mL、ニトロプルシッドナトリウム溶液 0.4mL、酸化剤液 1 mL、を毎回よく混合しながら、この順に加える。
- (3) 室温（暗所）で 1 時間以上静置する。
- (4) 分光光度計を用いて波長 640nm の吸光度を測定し、検量線から濃度を求める。

#### b) 亜硝酸イオン

亜硝酸イオンの定量はナフチルエチレンジアミン法により行った。リアクターから採取した汚泥混合液を遠心分離（3500rpm, 3-5min.）し、上澄み液を 0.45 $\mu$ m のメンブレンフィルター（Cellulose acetate）でろ過したものを供試検体とした。以下に分析の詳細を示す。

#### 使用する器具・装置

分光光度計  
25mL 比色管, etc.  
汲んだばかりの超純水

#### 試薬

- ・スルファニルアミド溶液  
塩酸 60mL と超純水約 80mL の混合液にスルファニルアミド（4-アミノベンゼンスルホンアミド）2g を加えて溶かす。さらに超純水を加えて、200mL に定容する。
- ・N-(1-ナフチル)エチレンジアミン溶液  
N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩 0.2g を超純水に溶かして 200mL とする。遮光保存。
- ・亜硝酸性窒素標準原液（250mgN L<sup>-1</sup>）  
亜硝酸ナトリウム 1.23g を正確に秤量し、超純水で 1 L に定容する。これにクロロホルム 1mL を加え、冷蔵保存する。

#### 検量線の作成

- (1) 亜硝酸性窒素標準原液（250mgN L<sup>-1</sup>）から 0 - 0.2mgN/L の範囲で 5 段階以上の標準液を、各 10mL ずつ、25mL 比色管内に作成する。
- (2) 試料と同様に発色させ、亜硝酸態窒素濃度と吸光度の関係から、検量線を作成する。

#### 測定

- (1) 25mL 比色管に亜硝酸性窒素が 0.2mgN L<sup>-1</sup> になるように調整した試料を 10mL とる。
- (2) スルファニルアミド溶液 1mL を各試料に加えよく混合し、5 分間静置する。
- (3) N-(1-ナフチル)エチレンジアミン溶液を 1 mL 加え、よく混合し 20 分間室温（暗所）で静置する。
- (4) 分光光度計を用いて波長 540nm の吸光度を測定し、検量線から濃度を求める。

#### c) 硝酸イオン，硫酸イオン，チオ硫酸イオン

硝酸イオン，硫酸イオン，チオ硫酸イオンは水溶液中で陰イオンとして存在している。本研究では陰イオン分離カラムを搭載したイオンクロマトグラフィー（Compact IC

761, メトローム) により, これらのイオンを定量した。

採取した汚泥混合液を遠心分離 (3500rpm, 3-5min.) し, その上澄みを 0.45 $\mu$ m のメンブレンフィルター( Cellulose acetate )でろ過したものを適当に希釈し, 分析に供した。また, 同定・定量のための標準溶液を各成分につき調製し, そのピーク面積から検量線を作成した。得られた供試検体のピーク面積値と検量線から, 各イオン濃度を求めた。

d) 溶存有機態炭素

溶存有機態炭素 ( Dissolved Organic Carbon; DOC ) は下水試験法 ( 1997 ) に従い, 上澄み液中の全有機態炭素 ( Total Organic Carbon; TOC ) と定義し, 測定には TOC-V ( 島津製作所 ) の NPOC ( Non-Purgeable Organic Carbon; 不揮発性有機態炭素 ) 測定モードを用いた。この方法では, 供試検体に酸を加えて pH<3 にした後スパージガスを通気することで検体中の無機態炭素を二酸化炭素 ( CO<sub>2</sub> ) となり除去した後に測定した TOC をもって, DOC を測定する方法である。

分析には, 採取した汚泥混合液を遠心分離 (3500rpm, 3-5min.) し, その上澄みを 0.45 $\mu$ m のメンブレンフィルター ( Cellulose acetate ) でろ過後, 適当に希釈したものを供した。また, 定量のための標準液としてフタル酸水素カリウム溶液を用意した。NPOC 法による測定で得られたピーク面積値から, DOC 濃度を求めた。

e) MLSS, MLVSS

MLSS ( Mixed Liquor Suspended Solids; 汚泥混合液浮遊物質 ), MLVSS ( Mixed Liquor Suspended Solids; 汚泥混合液揮発性浮遊物質 ) の定義および測定方法は下水試験法 ( 1997 ) に倣った。以下に測定手順の詳細を述べる。

蒸発皿を 600 で 30 分乾燥させ, 秤量する ( A )。

リアクターから汚泥混合液 25mL  $\times$  2 を採取。遠沈管にいれ, 3500rpm, 5min. 遠心。

上清を捨て, 無機塩類を完全に取り除くため RO 水を入れて汚泥を懸濁させもう一度遠心。

A の蒸発皿に汚泥をとり, 湯浴上で水分を蒸発させる。

110 オープンで 2 時間乾燥させ, デシケータ中で放冷。その後秤量 ( B )。

600 オープンで 30 分乾燥, 放冷(110 オープン, デシケータで), 秤量 ( C )。  
の手順より得られた A, B, C を用いた以下の計算式により, MLSS, MLVSS を算出する。

$$\text{MLSS} = (A - B) \times 40000 \quad [\text{mg L}^{-1}]$$

$$\text{MLVSS} = (B - C) \times 40000 \quad [\text{mg L}^{-1}]$$

## 3.2 硝化細菌群集解析

---

3.1 において構築された実験室規模活性汚泥リアクターにおいて、硝化反応の主役である硝化細菌群集の挙動解析を行った。硝化反応を担う硝化細菌群は大きく二つのグループに分けられる。すなわちアンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) を亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) まで酸化するアンモニア酸化細菌 (Ammonium Oxidizing Bacteria; AOB) と、亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) を硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) まで酸化する亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) である。亜硝酸型硝化反応は、AOB の活性が維持された状態で NOB の活性が抑制された場合にのみ起こると考えられる。よって、本実験室規模活性汚泥リアクターの亜硝酸型硝化反応を議論するうえで、AOB および NOB の動態を解析は必要不可欠であると考ええる。

本研究では、リアクターの運転期間中における AOB、NOB の存在量、存在属あるいは存在種の変動を把握するために、分子生物学的な手法による解析を行った。AOB、NOB 存在量の把握には定量的 PCR の一手法である QPrimer-PCR 法 (Kurata et al., 2001) を、存在属/存在種の把握には FISH 法 (Amann et al, 1995-a), PCR-Cloning-Sequencing 法 (Giovannoni et al., 1990), PCR-TRFLP (Moeseneder et al., 1999) を用いた。以下にそれぞれの実験について詳説する。

### 3.2.1 活性汚泥サンプルの採取

硝化細菌群集解析用の活性汚泥サンプルは以下の要領で採取・保存した。サンプル採取は毎回のリアクターの水質モニタリングのときに行った。

#### (1) FISH 法による解析に用いるための活性汚泥サンプルの採取

1. 曝気 (硝化) 過程中のリアクターから汚泥混合液 1.0mL を凍結保存用の 1.8mL 容クライオチューブ (Nalge Nunc International) に採取した。
2. すぐに-80 に急冷し、分析に供するまでそのまま凍結保存した。

#### (2) DNA 抽出に供するための活性汚泥サンプルの採取

1. 曝気 (硝化) 過程中のリアクターから汚泥混合液 1.0mL を凍結保存用の 1.8mL 容クライオチューブ (Nalge Nunc International) に採取した。
2. 遠心分離 (3500rpm, 10min.) を行い、上澄み液をデカンテーションにより除去した。
3. TE buffer を 1.0 mL 加え、汚泥を手で軽く分散させ、再び遠心分離 (3500rpm, 10min.) を行った。
4. 上澄み液をデカンテーションにより除去し、DNA 抽出に供するまで-80 で凍結保存した。

### 3.2.2 DNA の抽出

DNA の抽出は FastDNA® SPIN Kit for Soil( Qbiogene ,現 MP Biomedicals )により行った。抽出はキットに付属のプロトコルに従って行った。以下に手順について記す。

1. -80 °C で凍結保存された活性汚泥サンプル ( 3.2.1 (2) ) を解凍し , Lysing Matrix E Tube に移した。
2. 978  $\mu$ L の Sodium Phosphate Buffer と 122  $\mu$ L の MT buffer を加えた Lysing Matrix E Tube を FastPrep® Instrument( Qbiogene ,現 MP Biomedicals )にセットし , speed 5.5 , 30 sec. で細胞破碎処理を行った。
3. 遠心分離 ( 14000 g, 30 sec. ) を行い , マイクロピペットで上澄み液を新しいチューブに移し , 250  $\mu$ L の PPS reagent を加え , 10 回転倒混和した。
4. 遠心分離 ( 14000 g, 5 min. ) し , マイクロピペットをもちいて上澄み液を 15 mL チューブに移した。Binding Matrix を 1 mL 加え 2 分間転倒混和したのち , 3 分間静置した。
5. 上澄み液を 500  $\mu$ L 捨て , 再び混和した。混和液を SPIN™ Filter に移し , 14000 g で 1 分間遠心分離した。
6. Catch tube に通過した液 ( flow-through ) を捨てた。500  $\mu$ L の SEWS-M を Filter 上に加え , 再び遠心分離 ( 14000 g, 1 min. ) , flow-through を捨てた。
7. Filter 上の Binding Matrix-DNA 結合体に 100  $\mu$ L の DES を加えピペッティングし , DNA を溶出した。Filter を新しいチューブに移し遠心分離 ( 14000 g, 1 min. ) することで DNA を回収した。回収した DNA は解析に供するまで -20 °C で凍結保存した。

上記手順により得られた DNA 抽出産物中の DNA 濃度を NanoDrop ND-1000 ( NanoDrop ) を用いて吸光度 260 nm の波長を測定することにより求めた。測定値は各種解析の際の濃度調整の際に活用した。

### 3.2.3 FISH ( Fluorescence *in situ* Hybridization )

第 2 章で述べたように , AOB 群を一度に広く捉えることのできる PCR primer や FISH probe が存在する一方で , NOB 群に対してはそのようなツールは現時点で存在しない。したがって , リアクター内 NOB の定量/定性を行う前に , NOB として知られている *Nitrobacter* , *Nitrospira* , *Nitrococcus* , *Nitrospina* の 4 属のうちリアクター内に優占している属を決定する必要があった。

NOB を標的にした既存の FISH probe の一覧は第 2 章で紹介した通りであり , 本研究では Table 3-5 に示した 4 つの NOB-target probe を用いた。これらの probe はそれぞれ *Nitrobacter* , *Nitrospira* , *Nitrococcus* , *Nitrospina* に特異的であるとされており , これらの probe による細胞の検出の有無で , リアクター内における優占 NOB 属を決定することとした。また EUB-mix probe ( EUB- , EUB- , EUB- の混合 probe ) を作成し , 対比染色に用いた。供試検体は

亜硝酸酸化活性が活発であったリアクター運転 8 日目の汚泥を用いた。

Table 3-5 使用 probe 一覧

| probe name | sequence                     | specificity         | Fc [%] | reference            |
|------------|------------------------------|---------------------|--------|----------------------|
| EUB338-    | 5'- GCTGCCTCCCGTAGGAGT -3'   | Eubacteria          | 20-35  | Amann et al. (1990)  |
| EUB338-    | 5'- GCAGCCACCCGTAGGTGT -3'   | Eubacteria          | 35     | Amann et al. (1990)  |
| EUB338-    | 5'- GCTGCCACCCGTAGGTGT -3'   | Eubacteria          | 35     | Amann et al. (1990)  |
| NIT3       | 5'- CCTGTGCTCCATGCTCCG -3'   | Nitrobacter spp.    | 40     | Wagner et al. (1996) |
| Ntspa662   | 5'- GGAATTCCGCGCTCCTCT -3'   | genus Nitrospira    | 35     | Daims et al. (2001)  |
| Ntspn693   | 5'- TTCCCAATATCAACGCATTT -3' | Nitrospina gracilis | 20     | Juretschko S. (2000) |
| Ntcoc84    | 5'- TCGCCAGCCACCTTTCCG -3'   | Nitrococcus mobilis | 10     | Juretschko S. (2000) |

Fc: Formamideconcentration

FISH 法の操作手順は基本的に Amann et al. (1995) に従った。以下にその詳細について記す。

#### (1) サンプルの固定とスライドガラスの作成

1. -80 で保存したリアクター運転 8 日目の活性汚泥サンプル (3.2.1 参照) を解凍した。サンプル 200 $\mu$ L に対し固定液 (4% paraformaldehyde) 600 $\mu$ L を加え, 4 で 1-3 時間固定した。
2. 5000g で遠心分離し固定液を捨てた。固定液を完全に除去するために, 1 $\times$  PBS を適量加え懸濁し, 再び遠心分離後, 上澄み液を捨てた。
3. 1 $\times$  PBS, 氷冷したエタノールをそれぞれ 200 $\mu$ L 加え, 氷冷しながら超音波分散を行った (10W, 4min. )
4. 予めゼラチンコート (0.1% ゼラチン溶液に 2 分間浸し, 風乾) を施したスライドガラスのウェル一つに 2 $\mu$ L ずつ固定, 超音波分散の済んだサンプルを分注, 風乾し, 供試標本とした。

#### (2) プロブハイブリダイゼーション

1. 10  $\mu$ M に濃度調製した oligonucleotide probe 1 容に対し hybridization buffer (x% formamide, 0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 0.01% SDS, pH7.2) 8 容を加え, 標本スライドガラス上の各ウェルに 9 $\mu$ L ずつ滴下した。
2. hybridization buffer を染み込ませたる紙を入れ, ハイブリダイゼーション温度 (46 ) で気液平衡状態にしておいた 50 mL ポリプロピレン遠沈管にスライドガラスを入れ, ハイブリダイゼーションを行った (46 , 2 時間 )
3. スライドガラスをポリプロピレン遠沈管から取り出し, ハイブリダイゼーション温度に保っておいた Washing buffer (y M NaCl, 0.01% SDS, 20mM Tris-HCl) で未結合 probe を軽く洗い流した。
4. さらに washing buffer の入った 50 mL ポリプロピレン遠沈管にスライドガラスを浸し, ハイブリダイゼーション温度で 20 分静置した。
5. スライドガラスを取り出し, MilliQ 水で washing buffer を洗い流し, すぐにスライドガラスを振って水を切り, 暗所で空気乾燥した。

### (3) 顕微鏡観察

顕微鏡観察には蛍光顕微鏡 (DP70, Olympus) を用いた。明視野, 緑色励起 (FITC 標識した EUB mix probe の観察), 赤色励起 (Cy3 標識した NOB 標的 probe の観察) について画像を撮り, 蛍光の確認を行った。

#### 3.2.4 PCR primer の選定と PCR 条件

硝化細菌を標的にした PCR (Polymerase Chain Reaction) 用の primer が設計されている。本研究では, 実験室規模活性汚泥リアクター内における既知の AOB および NOB の定量/定性を行うことを掲げているため, より幅広くかつ特異的に AOB・NOB を捉えられる PCR primer を用いた解析を行うことが肝要であった。

AOB を標的にした primer としては, 第 2 章で紹介したものが知られているが, 本研究では Rotthauwe et al. (1997) が設計した *amoA*-1F, *amoA*-2R primer set を用いることとした (Table 3-6)。この primer set は, *Betaproteobacteria* に属する AOB (betabacterial AOB;  $\beta$ -AOB) が有するタンパク質 ammonia monooxygenase subunit A (*AmoA*) をコードする機能遺伝子 *amoA* を標的としたものであり (Rotthauwe et al., 1997) 使用実績も数多い (ref.)。 *amoA* を標的にすることで, 16S rDNA を標的にした PCR よりも特異的に AOB を捉えられることを期待した。また, 数ある既知の細菌の機能遺伝子の中でも *amoA* 塩基配列のデータベースは充実しており, 得られた *amoA* 配列から近縁種を求めることは十分可能であると考えられている (Purkhold et al., 2000, Aakra et al., 2001, Purkhold et al., 2003)。

本研究では, 4.2.3 の FISH 法によりリアクター内の優占属と決定された (第 5 章参照) *Nitrobacter* 属の 16S rDNA を標的とする FGPS872f-1269r primer set を用いることとした (Table 3-6)。既知の NOB は 16S rRNA 塩基配列に基づいた分類では 4 つもの属に散在して存在しているため (第 2 章参照), それら全てを特異的に捉える primer の設計は困難であり, 現時点で開発についての報告はない。現在開発されている NOB 16S rDNA を標的にする primer set としては, *Nitrobacter* 属 ( $\alpha$ -proteobacteria) を特異的に増幅する FGPS872f-1269r (Degrange & Bardin, 1995) と *Nitrospira* 属 (*Nitrospira*) を特異的に増幅する NSR1113f-1264r (Doinishi et al., 2002) が知られている。16S rDNA を標的とする primer のほかにも, *Nitrobacter hamburgensis* の亜硝酸酸化還元酵素 (NOR) をコードする機能遺伝子 *norB* の塩基配列から設計された norB269f-443r primer set の開発が報告されている (赤司, 2004) が, このプライマーの実績は皆無に等しい。

Table 3-6 PCR primer

| Primer                        | Sequence (5'-3')   | Target                   | Reference              |
|-------------------------------|--|--------------------------|------------------------|
| <i>amoA</i> -1F-2R primer set | <i>amoA</i> -1F<br>GGGGTTTCTACTGGTGGT<br><i>amoA</i> -2R<br>CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC | $\beta$ -AOB             | Rotthauwe et al., 1997 |
| FGPS872f-1269r primer set     | FGPS872f<br>CTAAAACTCAAAGGAATTGA<br>FGPS1269r<br>TTTTTTGAGATTGCTAG               | genus <i>Nitrobacter</i> | Degrang & Bardin, 1995 |

[K= G or T, S= G or C]



以下に本研究において一貫して用いた PCR 条件と , アガロース電気泳動による PCR 産物の確認について述べる。

#### ( 1 ) PCR 条件

本研究における *amoA*-1F-2R および FGPS872f-1269r を用いた PCR は , 特に断りのない限り Table 3-7 の条件で行った。

**Table 3-7 PCR 条件**

| <i>amoA</i> -PCR                                       |                    |                  | FGPS-PCR   |                    |                  |
|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|
| Primer   |                    |                  | Primer   |                    |                  |
| <i>amoA</i> -1F: 5'- ggg gtt tct act ggt ggt -3'       |                    |                  | FGPS872f: 5'- cta aaa ctc aaa gga att ga -3'           |                    |                  |
| <i>amoA</i> -2R: 5'- ccc ctc kqs aaa gcc ttc ttc- 3'   |                    |                  | FGPS1269r: 5'- ttt ttt gag att tgc taq -3'             |                    |                  |
| PCR mixture  |                    |                  | PCR mixture  |                    |                  |
|  | Final conc         | volume [μL]      |  | Final conc         | volume [μL]      |
| ddH <sub>2</sub> O                                     | -                  | 29.5             | ddH <sub>2</sub> O                                     | -                  | 29               |
| 10xAmpliTaq PCR buffer (with 1.5mM MgCl <sub>2</sub> ) | 1x                 | 5                | 10xAmpliTaq PCR buffer (with 1.5mM MgCl <sub>2</sub> ) | 1x                 | 5                |
| 2mM dNTP   | 0.2 mM             | 5                | 2mM dNTP   | 0.2 mM             | 5                |
| 100μM forward primer                                   | 0.25 μM            | 0.125            | 100μM forward primer                                   | 0.5 μM             | 0.25             |
| 100μM reverse primer                                   | 0.25 μM            | 0.125            | 100μM reverse primer                                   | 0.5 μM             | 0.25             |
| 5U/μL AmpliTaq Gold                                    | 1.25 unit          | 0.25             | 5U/μL AmpliTaq Gold                                    | 2.5 unit           | 0.5              |
| template (5ng/ μL)                                     | 50ng               | 10               | template (5ng/ μL)                                     | 50ng               | 10               |
| total  | -                  | 50               | total  | -                  | 50               |
| Thermalcycler program                                  |                    |                  | Thermalcycler program                                  |                    |                  |
| step   | temperature [ °C ] | incubation [sec] | step   | temperature [ °C ] | incubation [sec] |
| hot start  | 94                 | 600              | hot start  | 95                 | 600              |
| denature   | 94                 | 15               | denature   | 94                 | 45               |
| anneal   | 55                 | 20               | anneal   | 50                 | 45               |
| extention  | 72                 | 120              | extention  | 72                 | 90               |
| final extention  | 72                 | 300              | final extention  | 72                 | 600              |

#### ( 2 ) アガロース電気泳動による PCR 産物の確認

PCR 産物が , 目的とする標的配列が正しく増幅されたものであることを確認する手法としてのアガロースゲル電気泳動を活用した。アガロースゲルにアプライされた DNA 断片は , その長さによって異なる電気泳動距離を示す。よって , 既知の DNA 断片長からなる DNA マーカーとともに PCR 産物を電気泳動することで , PCR 産物が標的 DNA 断片長に等しい長さであるかが確認できる。以下にアガロース電気泳動の手順を示した。

1. Agarose S ( 日本ゼン ) を 1 × TAE に溶かし , 1.0-1.5% ( w/mL ) アガロースゲルを作成した。
2. i-Mupid-J ( ADVANCE ) にアガロースゲルをセットし , PCR 産物 5 μL と 6 × Loading Dye 1 μL を混合後 , ゲルのウェルにローディングした。DNA マーカーには DNA Ladder Markers, 100bp DNA Ladder ( TOYOBO ) を用いた。
3. 100 V で 15-20 分電気泳動したのち , 5 万倍希釈したエチジウムブロマイド溶液 ( BIO-RAD ) に 15-20 分染色した。
4. 染色が済んだゲルを UV-Transilluminator ( FAS- システム , TOYOBO ) にセットし , 観察することで , 目的の DNA 断片長の増幅を確認した。

### 3.2.5 QPrimer-PCR

QPrimer-PCR 法は、5'末端を蛍光色素 BODIPY<sup>®</sup>で修飾した oligonucleotide primer を使用して PCR 増幅をリアルタイムで検出する、定量的 PCR 法の一手法である( Kurata et al., 2001 )。本研究では、*amoA*-1F-2R primer set と FGPS872f-1269r primer set を用いて、 $\beta$ -AOB 由来 *amoA* と *Nitrobacter* 属由来 16S rDNA の QPrimer-PCR 法による定量を行った。

#### (1) QPrimer-PCR 用 primer の作成

QPrimer-PCR に用いる primer set は、forward 側か reverse 側のどちらの 5'末端が BODIPY<sup>®</sup>修飾されている必要がある。また、グアニン (G) との相互作用によりその蛍光が消える、という BODIPY<sup>®</sup>の性質を利用した蛍光消光反応を利用するためには、BODIPY<sup>®</sup>修飾する末端はシトシン (C) である必要がある。本研究では、*amoA* をターゲットとした QPrimer-PCR 法には *amoA*-1F 5'末端に C を付加したものに (Table 3-8)、*Nitrobacter* 16S rDNA をターゲットとした QPrimer-PCR 法には FGPS872f 5'末端( もともと C )に (Table 3-9)、それぞれ BODIPY<sup>®</sup>修飾を施した。BODIPY<sup>®</sup>修飾 primer の作成は環境エンジニアリング(株)に依頼した。

#### (2) 外部標準サンプルの調製

定量のための外部標準サンプルを以下の要領で調製した。

1. 本研究で用いたリアクターから採取した運転 11 日目の活性汚泥から、4.2.2 の要領で抽出した DNA をテンプレートとした PCR を行った。PCR primer は、*amoA* 定量用の標準サンプルの作成には *amoA*-1F-2R primer set (Table 3-6) を、*Nitrobacter* 属由来 16S rDNA の標準サンプルの作成には FGPS872f-1269r primer set (Table 3-6) を用いた。PCR mixture の組成とサーマルサイクラー (T3 Thermocycler, Biometra) プログラムは 4.2.4 に準じた。
2. 得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製し、精製産物中の DNA 濃度を NanoDrop ND-1000( NanoDrop )を用いて吸光度 260 nm の波長を測定することにより求めた。
3. DNA 濃度から、以下の式により PCR-精製産物中の *amoA*-1F-2R 領域 (491 bp) あるいは FGPS872f-1269r 領域 (397 bp) の DNA 断片のコピー数を算出した。

$$\text{DNAコピー数} = \frac{\text{DNA濃度}[\text{ng} / \mu\text{L}] \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{塩基長}[\text{bp}] \times 660}$$

4. 算出したコピー数を元に、PCR-精製産物を適宜希釈し、 $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ , copies  $\mu\text{L}^{-1}$  の標準サンプルを作成した。

(3) LightCycler® (Roche Diagnostics) による Real-time 定量

Real-time 定量には LightCycler® (Roche Diagnostics) を用いた。Table 3-8, Table 3-9 に *amoA* および *Nitrobacter* 16S rDNA 定量のための PCR mixture の組成と LightCycler® のプログラムを示した。検量線作成のために、LightCycler® 専用キャピラリー内に  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  コピーの標的 DNA 断片がテンプレートとして存在する外部標準サンプルを作成した。データの解析には Macro for LightCycler ver.2.2 for win (環境エンジニアリング) を用いた。定量は各サンプルについて 3 反復行い、平均値と標準偏差を求めた。

Table 3-8 *amoA* を標的とした QPrimer-PCR の条件

| <i>amoA</i> primer set for QPrimer-PCR                        |                |                 |  |                  |                  |                                      |                |                  |
|---|----------------|-----------------|--|------------------|------------------|--------------------------------------|----------------|------------------|
| BODIPY- <i>amoA</i> -1F : 5'-(BODIPY)-C-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3' |                |                 |  |                  |                  |                                      |                |                  |
| <i>amoA</i> -2F : 5'-CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC-3'                  |                |                 |  |                  |                  |                                      |                |                  |
| Qprimer-PCR mixture (for <i>amoA</i> )                        |                |                 | LightCycler program (for <i>amoA</i> ) |                  |                  |                                      |                |                  |
| component   | Final conc.    | Vol. [ $\mu$ L] | step                                   | Temperature [°C] | Incubation [sec] | Temperature Transition Rate (°C/sec) | Analysis mode  | Acquisition mode |
| ddH <sub>2</sub> O  | -              | 5.02            | hot start                              | 95               | 120              | 20                                   | None           | NONE             |
| 10xTITANIUM buffer  | 1x             | 2.00            | (denaturation)                         | 95               | 15               | 20                                   | Quantification | SINGLE           |
| 10mg/ml BSA   | 0.25mg/mL      | 0.50            | (annealing)                            | 61               | 10               | 20                                   |                | NONE             |
| 2.5 mM dNTP   | 0.2mM          | 1.60            | (extension)                            | 72               | 30               | 20                                   |                | SINGLE           |
| 10 $\mu$ M forward primer                                     | 0.12 $\mu$ M   | 0.24            | final extension                        | 72               | 120              | 20                                   | None           | NONE             |
| 10 $\mu$ M reverse primer                                     | 0.12 $\mu$ M   | 0.24            | melting curve                          | 95               | 30               | 20                                   | Melting Curve  | NONE             |
| 50x TITANIUM Taq  | 1x             | 0.40            |  | 50               | 120              | 0.1                                  |                | NONE             |
| template DNA (5ng/ $\mu$ L)                                   | 2.5ng/ $\mu$ L | 10.0            |  | 95               | 0                | 20                                   |                | CONT             |
| mixture total volume  | -              | 20.0            | cooling                                | 40               | 30               | 20                                   | None           | NONE             |

Table 3-9 *Nitrobacter* 16S rDNA を標的とした QPrimer-PCR の条件

| FGPS primer set for QPrimer-PCR                      |                |                 |                                |                  |                  |                                      |                |                  |
|--|----------------|-----------------|--------------------------------|------------------|------------------|--------------------------------------|----------------|------------------|
| BODIPY-FGPS872f : 5'-(BODIPY)-CTAAACTCAAAGGAATTGA-3' |                |                 |                                |                  |                  |                                      |                |                  |
| FGPS1269r : 5'-TTTTTTGAGATTGCTAG-3'                  |                |                 |                                |                  |                  |                                      |                |                  |
| Qprimer-PCR mixture (for FGPS)                       |                |                 | LightCycler program (for FGPS) |                  |                  |                                      |                |                  |
| component  | Final conc.    | Vol. [ $\mu$ L] | step                           | Temperature [°C] | Incubation [sec] | Temperature Transition Rate (°C/sec) | Analysis mode  | Acquisition mode |
| ddH <sub>2</sub> O                                   | -              | 3.9             | hot start                      | 95               | 300              | 20                                   | None           | NONE             |
| 10x KOD PCR buffer                                   | 1x             | 2.0             | (denaturation)                 | 94               | 30               | 20                                   | Quantification | SINGLE           |
| 25mM MgSO <sub>4</sub>                               | 1.0 mM         | 0.8             | (annealing)                    | 48               | 30               | 20                                   |                | NONE             |
| 10mg/ml BSA  | 0.25mg/mL      | 0.5             | (extension)                    | 68               | 30               | 20                                   |                | SINGLE           |
| 2mM dNTP   | 0.2mM          | 2.0             | final extension                | 68               | 300              | 20                                   | None           | NONE             |
| 10 $\mu$ M forward primer                            | 0.1 $\mu$ M    | 0.2             | melting curve                  | 95               | 45               | 20                                   | Melting Curve  | NONE             |
| 10 $\mu$ M reverse primer                            | 0.1 $\mu$ M    | 0.2             |                                | 50               | 120              | 0.2                                  |                | NONE             |
| 1unit KOD-plus-                                      | 0.02unit       | 0.4             |                                | 90               | 0                | 20                                   |                | CONT             |
| templateDNA (5ng/ $\mu$ L)                           | 2.5ng/ $\mu$ L | 10              | cooling                        | 40               | 30               | 20                                   | None           | NONE             |
| mixture total volume                                 | -              | 10              |                                |                  |                  |                                      |                |                  |

### 3.2.6 PCR-Cloning-Sequencing

*amoA*-1F-2R primer set および FGPS872f-1269r primer set を用いた PCR-Cloning-Sequencing 法により運転 92 日目と運転 257 日目のリアクター内に存在する AOB(β-AOB)由来 *amoA* , 運転 92 日目のリアクター内に存在する NOB (*Nitrobacter*) 由来 16S rDNA の塩基配列を求めた。以下に手順の詳細を記す。

#### (1) PCR

*amoA* を標的にした PCR-Cloning には運転 92 日目と運転 257 日目の活性汚泥から得られた DNA を, *Nitrobacter* 16S rDNA を標的にした PCR-Cloning には運転 92 日目の活性汚泥から得られた DNA をテンプレートとして用いた。

PCR primer は *amoA*-1F-2R primer set および FGPS872f-1269r primer set とし, PCR mixture およびサイクル数以外のサーマルサイクラープログラムは基本的に 4.2.2 に準じた。増幅産物の組成がテンプレートのそれを反映するような PCR サイクル数の検討を行った。アガロースゲル電気泳動で増幅産物が確認できる PCR サイクル数の最小値を求めた結果, *amoA*-1F-2R を用いた PCR は 30 サイクル, FGPS872f-1269r を用いた PCR は 25 サイクルで行うこととした。

#### (2) Cloning

Cloning には QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN) を用い, 実験手順は QIAGEN が配布している「QIAGEN® PCR Cloning Handbook (April 2001)」に従った。(1)により得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製, Microcon™-100 (MILLIPORE) で濃縮し, 濃縮産物中の DNA 濃度が *amoA*-1F-2R PCR 産物なら 16.3-32.5 ng DNA  $\mu\text{L}^{-1}$  に, FGPS872f-1269r PCR 産物なら 13-26 ng DNA  $\mu\text{L}^{-1}$  になるように調製 (DNA 濃度の測定には NanoDrop ND-1000 を用いた) したものを Ligation に供した (Table 3-10)。

Transformation が済んだ大腸菌株は LB 培地 (Table 3-11) にスプレッドし, 37 °C で 15-18 時間培養した。

#### (3) Sequencing

得られたクローンをコロニーPCR (Table 3-12) にかけたものを Sequencing に供した。コロニー PCR 産物を Montage PCR  $\mu\text{96}$  (MILLIPORE) を用いて精製したのちに, Sequencing mixture (Table 3-13) を作成し, T3 Thermocycler (Biometra) を使用して sequencing reaction を行った (Table 3-14)。primer は, *amoA*-clone の Sequencing reaction には *amoA*-1F と *amoA*-2R を, *Nitrobacter* 16S rDNA(FGPS)-clone の Sequencing reaction には FGPS872f と FGPS1269r を用い, 全てのクローンについて forward 側と reverse 側の両側から Sequencing を行った。

Table 3-10 Ligation-reaction mixture

| Component   | volume            |
|---|-------------------|
| pDrive Cloning Vector (50 ng $\mu\text{L}^{-1}$ ) | 1 $\mu\text{L}$   |
| PCR product                                       | 1-2 $\mu\text{L}$ |
| Distilled water                                   | 3-2 $\mu\text{L}$ |
| 2 × Ligation Master Mix                           | 5 $\mu\text{L}$   |
| Total volume                                      | 10 $\mu\text{L}$  |

Table 3-11 LB 培地 (200 mL) の組成

| LB Broth (DIFCO) | Bact Agar (DIFCO) | X-gal | IPTG  | アンピシリン |
|------------------|-------------------|-------|-------|--------|
| 4 g              | 3 g               | 20 mg | 15 mL | 200 mg |

Table 3-12 コロニー-PCR

primer;

SP6: 5'- cat tta ggt gac act ata g -3'

T7: 5'- gta ata cga ctc act ata g -3'

## PCR mixture

|   | SP6-T7            |                          |
|---|-------------------|--------------------------|
|   | Final conc        | volume [ $\mu\text{L}$ ] |
| ddH <sub>2</sub> O  | -                 | 34.55                    |
| 10xAmpliTag PCR buffer<br>(with 1.5mM MgCl <sub>2</sub> ) | 1x                | 5.0                      |
| 2mM dNTP  | 0.2 mM            | 5.0                      |
| 100 $\mu\text{M}$ forward primer                          | 0.2 $\mu\text{M}$ | 0.1                      |
| 100 $\mu\text{M}$ reverse primer                          | 0.2 $\mu\text{M}$ | 0.1                      |
| 5U/ $\mu\text{L}$ AmpliTaq Gold                           | 1.25 U            | 0.25                     |
| template (colony in 50mL ddH <sub>2</sub> O)              | -                 | 5.0                      |
| total   | -                 | 50                       |

## PCR procedure (SP6-T7)

| step            | temperature [°C] | incubation [sec] | 30 cycles |
|-----------------|------------------|------------------|-----------|
| hot start       | 95               | 600              |           |
| denature        | 94               | 30               |           |
| anneal          | 52               | 30               |           |
| extention       | 72               | 120              |           |
| final extention | 72               | 600              |           |

Table 3-13 Sequencing reaction

primer:

*amoA* -1F: 5'- ggg gtt tct act ggt ggt -3'*amoA* -2R: 5'- ccc ctc kgs aaa gcc ttc -3'

or

FGPS872f: 5'- cta aaa ctc aaa gga att ga -3'

FGPS1269r: 5'- ttt ttt gag att tgc tag -3'

## Sequencing reaction mixture

|  | Final conc.        | volume [ $\mu\text{L}$ ] |
|--|--------------------|--------------------------|
| ddH <sub>2</sub> O                           | -                  | 4.68                     |
| 1/8 BigDye ver.3.1                           | 1/20               | 4.00                     |
| 10uM Primer                                  | 0.32 $\mu\text{M}$ | 0.32                     |
| template (colony in 50mL ddH <sub>2</sub> O) | -                  | 1.00                     |
| total  | -                  | 10.0                     |

## Sequencing reaction procedure

| step      | temperature [°C] | incubation [sec] | 25 cycles |
|-----------|------------------|------------------|-----------|
| hot start | 96               | 30               |           |
| denature  | 96               | 10               |           |
| anneal    | 50               | 5                |           |
| extention | 60               | 240              |           |

Sequencing reaction 産物を Montage SEQ (MILLIPORE) で精製したもの 10 $\mu$ L に Hi-Di formamide を 10  $\mu$ L 加え, ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によるキャピラリー電気泳動に供した。

得られた forward, reverse の塩基配列の波形データを assemble し, それをもって各 Clone の塩基配列情報とした。Assemble には, ソフトウェア AutoAssembler™ (Applied Biosystems) を用いた。

### 3.2.7 PCR-TRFLP

リアクター内の *amoA* の構成変化を追跡するため, *amoA* を標的にした PCR-TRFLP を行った。TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) は, 蛍光色素を付加した primer を用いて得た PCR 産物を制限酵素で切断し, その断片長からサンプル中の DNA の構造を推定する方法である。以下に手順について記す。

#### (1) PCR

primer *amoA*-1F の 5'末端に蛍光色素 6-Fam を付加したものを作成し (Table 3-14), 本実験における PCR に用いた (Table 3-7)。PCR は 3.2.6(1)と同様の条件で行った。供試検体は運転 57, 92, 133, 145, 159, 166, 174, 181, 194, 257, 299 日目の活性汚泥から抽出した DNA とした。

Table 3-14 TRFLP 用 *amoA* 標的 pirmer

|                  |   |
|------------------|---|
| <i>amoA</i> -1F: | 5'- (6-Fam) ggg gtt tct act ggt ggt -3' |
| <i>amoA</i> -2R: | 5'- ccc ctc kgs aaa gcc ttc ttc- 3'     |

#### (2) 制限酵素処理

3.2.6 の結果より得られたリアクター内の *amoA* 塩基配列情報をもとに, 使用する制限酵素の選定を DNASIS Pro (日立ソフトウェア) を用いて行った。リアクター内 *amoA* の特徴的な塩基配列を示した A28-*amoA*, B32-*amoA* の 2 クローンの塩基配列情報を DNASIS Pro に入力した。「制限酵素サイト検索」機能を利用して, A28-*amoA*, B32-*amoA* を異なる断片長で切断する制限酵素を検索した。

結果, A28-*amoA* を forward 側 5'末端から 77 bp の位置で, B32-*amoA* を 192 bp の位置で切断する制限酵素 *Mob* を使用することとした (Table 3-15)。

*Mbo* による PCR 産物の切断は Table 3-16 の通り行った。

Table 3-15 制限酵素 *Mbo*

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Restriction site              | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">G A T C<br/>C T A G</div>  |
| Source:                       | <i>Moraxella bovis</i>  |
| Concentration:                | 4-12 units/ $\mu$ l   |
| Supplied buffer:              | K   |
| Reaction temperature:         | 37 ° C  |
| Substrate for unit definition | N6-methyladenine free DNA   |
| Effect of DNA methylation     | Enzyme activity is affected by dam methylase.<br>Enzyme activity is not affected CG methylase. Therefore, generally available DNAs from <i>E. coli</i> are not cleavable. |

Table 3-16 制限酵素処理条件

| Reaction mixture                         |                 | Restriction enzyme reaction |                  |
|--|-----------------|-----------------------------|------------------|
| Component                                | vol. [ $\mu$ L] | temperature [ °C ]          | incubation [sec] |
| ddH <sub>2</sub> O                       | 6               | 37                          | 3 hr.            |
| 10x K buffer                             | 1               | 70                          | 15 min.          |
| <i>Mbo</i> (10 U $\mu$ L <sup>-1</sup> ) | 2               |                             |                  |
| Substrate (PCR product)                  | 1               |                             |                  |
| Total volume                             | 10              |                             |                  |

## (3) DNA 断片長の解析

制限酵素処理によって得られた DNA 断片の長さの解析は、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) の GeneScan モードにより行った。制限酵素処理の済んだ PCR 産物 5 $\mu$ L ,Hi-Di formamide 42  $\mu$ L ,DNA マーカー( GeneScan™-500 ROX™ size standard ,Applied Biosystems )0.5  $\mu$ L の混合液を作成した。混合液を熱処理( 95 °C , 2min. ) した後すぐに 5 分間氷冷し , ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer に供した。ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer の操作は付属マニュアルに準じて行った。

測定データの解析にはソフトウェア GeneMapper™( Applied Biosystems )を用いた。

## 第4章 実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築

本章では、第3章 3.1の方法で行った実験室規模活性汚泥リアクターにおける亜硝酸型硝化反応の獲得についての結果と考察について述べる。

第1章 1.2で述べたように、本章における実験の最大の目的は実験室規模において、亜硝酸型硝化反応をおこなう活性汚泥リアクターの構築に必要な条件を探索することであった。

本実験において構築されたリアクターは2004年12月8日から運転を開始し、現時点(2006年1月31日)も稼動中である。本実験は運転開始から2005年10月3日までの299日に及ぶ期間を対象に行われた。

### 4.1 実験室規模活性汚泥リアクター実験結果

---

リアクターの種汚泥は、新日本製鐵(株)先端技術研究所において2004年に立ち上げられたリアクターから採取したものを使用した。この種汚泥もとのプラントは2002-2003年に運転された、本研究におけるリアクター運転の参考にしたミニプラント(第2章参照)とは異なるものであり、種汚泥を分与いただいた時点では亜硝酸型硝化反応を示していなかった。本リアクター実験は2004年12月9日より299日間の運転期間を対象に行った。以降、本リアクターにおける水質モニタリングの結果についてまとめた。

#### 4.1.1 運転条件の変遷とリアクター水質モニタリング結果

##### (1) MLSS, MLVSS の変化

水質モニタリング結果の前に、本リアクターの活性汚泥の状況について簡単に触れる。Fig. 4-1にMLSS, MLVSSの経日変化を示した。運転64日目に $SS=860\text{ mg L}^{-1}$ まで減少しているが、これは活性汚泥濃度の減少によるものではなく、汚泥のリアクター壁面への著しい付着によるものであった。壁面に付着していた汚泥をはがすことでSSが一気に回復した(71日目,  $SS=3300\text{ mg L}^{-1}$ )。その後は高濃度のSSを維持した。フロックがよく発達した汚泥であり、運転期間を通じて沈降は極めて良好であった。



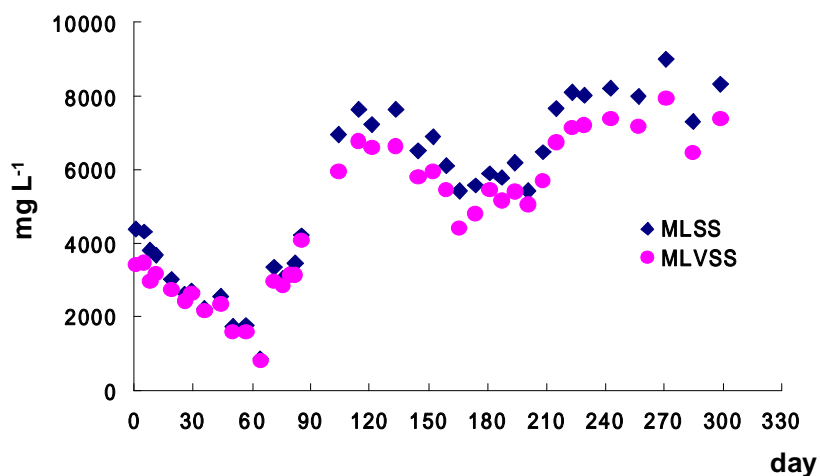
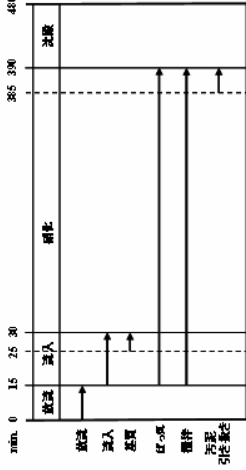
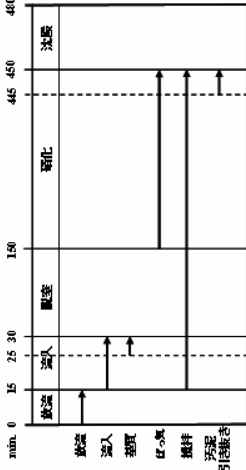
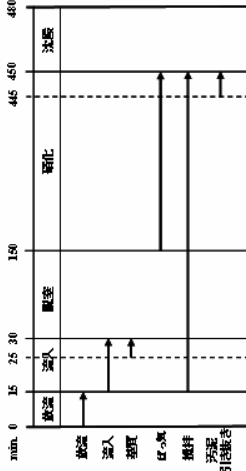


Fig. 4-1 運転期間中の MLSS, MLVSS の変動

## (2) 運転期間中の運転条件変更履歴

本リアクターでは、亜硝酸型硝化反応が得られるまで運転条件の変更を 2 度行った (Table 4-1)。運転開始当初は、1 サイクル (8 時間) の内訳が { 流入・放流 30 分 好気(硝化) 工程 360 分 沈殿工程 90 分 } という硝化反応に特化したサイクル設計であった。運転 75 日目に好気工程の前段に無酸素 (脱窒) 工程を導入し、1 サイクルの内訳を { 流入・放流 30 分 無酸素工程 120 分 好気工程 300 分 沈殿工程 30 分 } とした。また、運転 112 日目に、それまでは  $\text{pH} > 7.2$  であった  $\text{pH}$  の制御値を、 $\text{pH} > 8.0$  に変更した。

Table 4-1 リアクター運転条件履歴

|   |  |   |  |   |  |
|---|--|---|--|---|--|
| A. 運転開始～74日目  |  | B. 75～111日目   |  | C. 112～現在   |  |
| 有効容量 5L   |  | 有効容量 5L   |  | 有効容量 5L   |  |
| 系 連続回分式   |  | 系 連続回分式   |  | 系 連続回分式   |  |
| サイクル  |  | サイクル  |  | サイクル  |  |
|    |  |   |  |    |  |
| HRT 16時間  |  | HRT 16時間  |  | HRT 16時間  |  |
| SRT 20日   |  | SRT 20日   |  | SRT 20日   |  |
| ℃ 30℃   |  | ℃ 30℃   |  | ℃ 30℃   |  |
| pH > 7.2 (80 g NaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> で下限のみ制御)  |  | pH > 7.2 (80 g NaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> で下限のみ制御)  |  | pH > 8.0 (80 g NaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> で下限のみ制御)  |  |
| ばっ気 3L min <sup>-1</sup><br>合成廃水 基質 濃度 [mg L <sup>-1</sup> ]<br>Glucose 143<br>CH <sub>3</sub> COONa 196<br>NaHCO <sub>3</sub> 400<br>NH <sub>4</sub> Cl 600<br>CaCl <sub>2</sub> 50<br>MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 30<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50<br>Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 212<br>NaCl 14000 |  | ばっ気 3L min <sup>-1</sup><br>合成廃水 基質 濃度 [mg L <sup>-1</sup> ]<br>Glucose 362<br>CH <sub>3</sub> COONa 565<br>NaHCO <sub>3</sub> 400<br>NH <sub>4</sub> Cl 600<br>CaCl <sub>2</sub> 50<br>MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 30<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50<br>Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 212<br>NaCl 14000 |  | ばっ気 3L min <sup>-1</sup><br>合成廃水 基質 濃度 [mg L <sup>-1</sup> ]<br>Glucose 362<br>CH <sub>3</sub> COONa 565<br>NaHCO <sub>3</sub> 400<br>NH <sub>4</sub> Cl 600<br>CaCl <sub>2</sub> 50<br>MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 30<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50<br>Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 212<br>NaCl 14000 |  |

### (3) 処理水中溶存態窒素濃度の経日変化

Fig. 4-2 に合成排水流入直後のリアクター内の溶存態窒素濃度を、Fig. 4-3 に運転期間中の処理水中溶存態窒素濃度経日変化を示した。75 日目前後で処理水中の硝酸態窒素濃度が大きく異なっているが (Fig. 4-3)、これは硝化工程前段に導入した脱窒工程で直前のサイクルから持ち越された硝酸態窒素が除去されたことに因る。また、合成排水流入直後の硝酸態窒素濃度も 75 日目以降減少している (Fig. 4-3)。毎サイクル 15 分かけて行った合成排水流入の間にも脱窒が起こったことを示唆している。

処理水中の溶存態窒素濃度の変化と (2) の運転条件の変更履歴と照らし合わせて考えると、pH 制御値を変更後してから 1 ヶ月程度たった後に処理水中へのアンモニア態窒素の蓄積 (つまり、硝化工程におけるアンモニア酸化活性が失活) が観察され始め、さらに 1 ヶ月程度のちに処理水中への亜硝酸態窒素の蓄積 (硝化工程における亜硝酸型硝化反応) が観察された。この亜硝酸型硝化反応は、その後 120 日間程度安定して起こった。

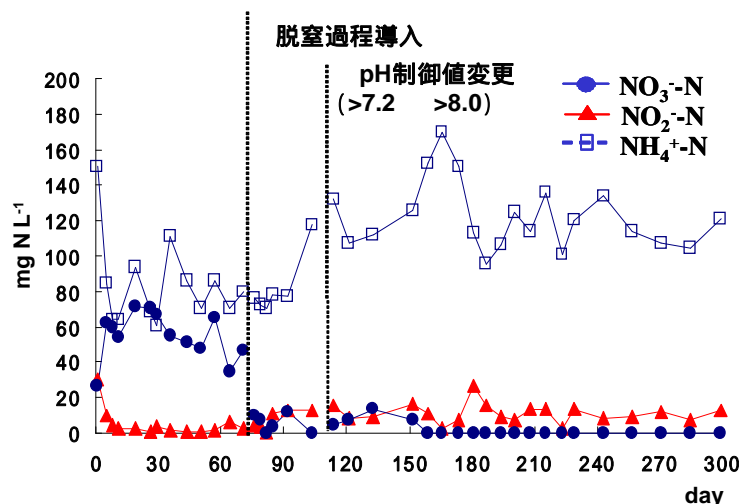


Fig. 4-2 合成排水流入直後のリアクター内溶存態窒素濃度の変化

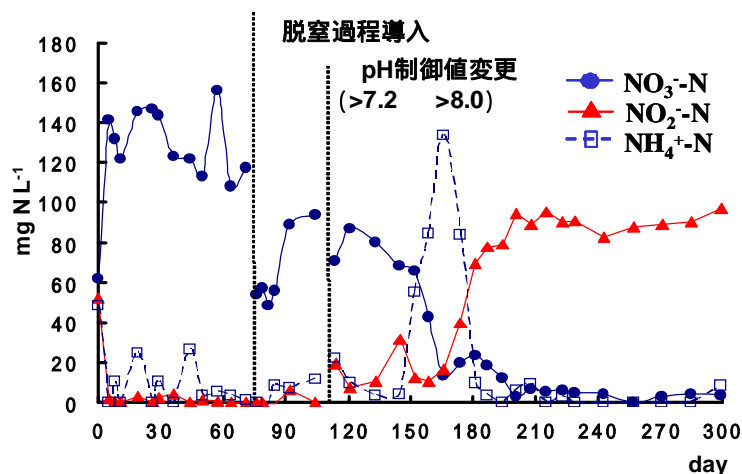


Fig. 4-3 処理水中溶存態窒素濃度の変化

#### 4.1.2 硝化反応速度の変化

本研究におけるリアクター水質モニタリングは、3日 2週間に一度の任意のサイクルにおいて合成排水流入直後から一連の処理工程が終わるまでの間に経時的に採取した汚泥混合液（Mixed liquor）中の溶存態物質に対して行った。4.1.1 ではその水質モニタリングのうちでも合成排水流入直後の水質と処理水質の経日的な変化に注目した記述したが、ここでは運転期間各時期におけるサイクル中の水質変化について述べたい。溶存態窒素成分のほかに、本研究が注目した溶存態硫黄化合物（チオ硫酸態硫黄、硫酸態硫黄）の動態についてもあわせて示す。

Fig. 4-4 に運転 0-75 日（硝化反応のみの運転期間）における典型的なモニタリング結果について示した。同様に、Fig. 4-5 では 76-111 日（脱窒工程導入後）における、Fig. 4-6 では 112-299 日（pH 変更後）における結果を示した。

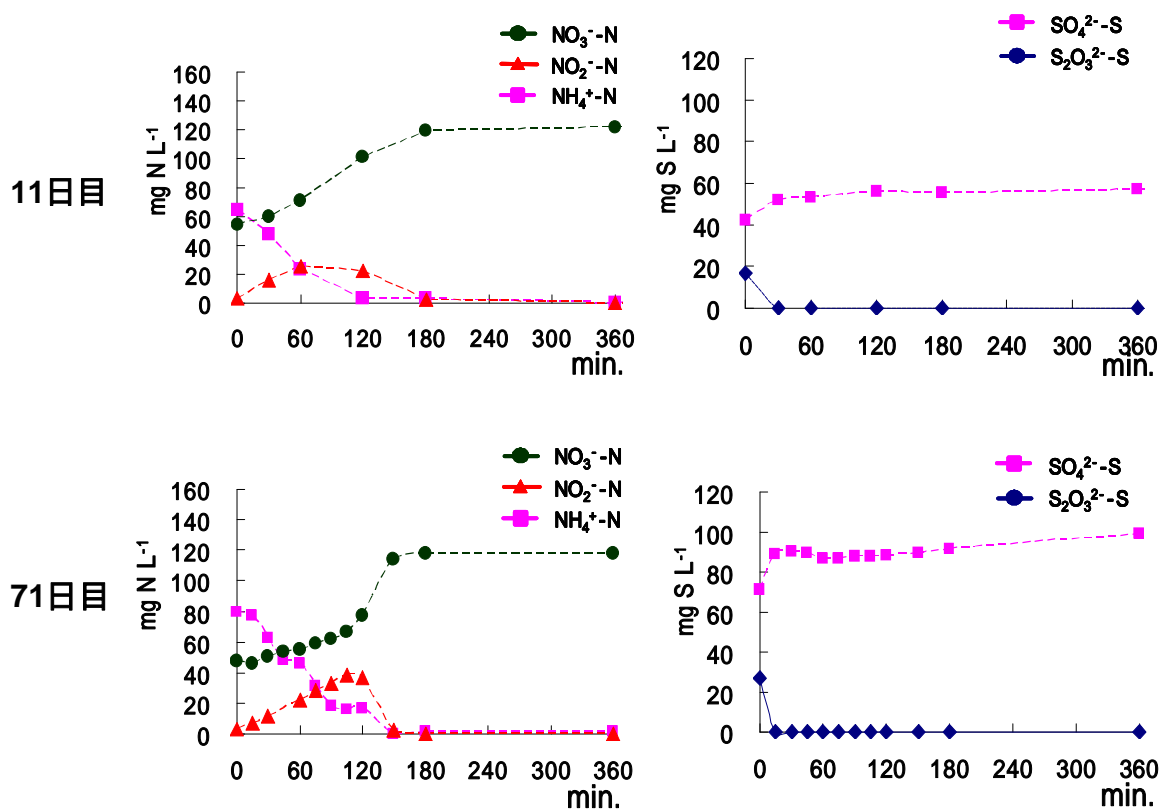


Fig. 4-4 リアクター内溶存態窒素濃度の経時変化；0日目から75日目（硝化工程のみ，完全硝化反応）における典型的なモニタリング結果を示した。

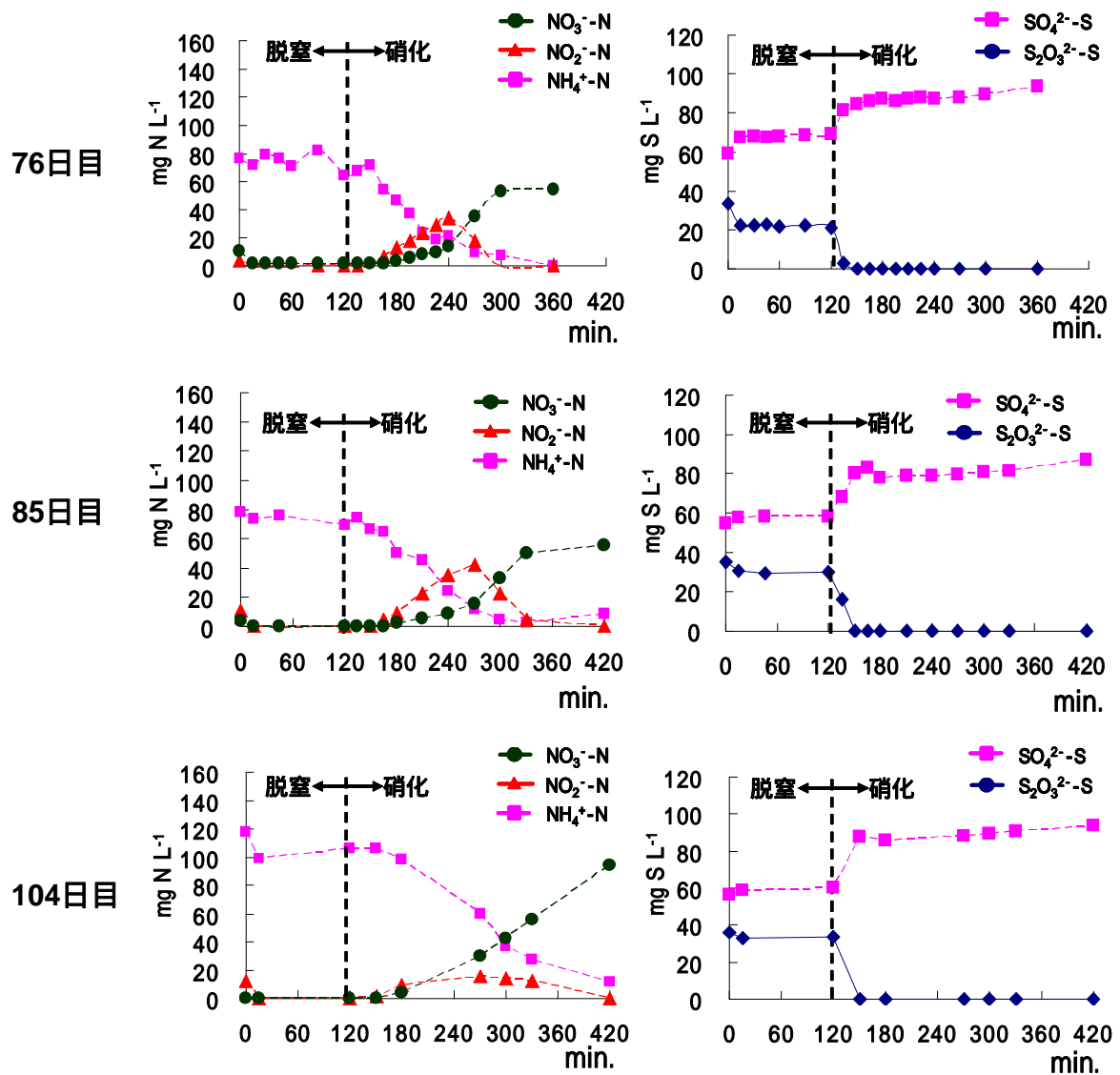


Fig. 4-5 リアクター内溶存態窒素濃度の経時変化；76-111日(脱窒工程導入後,完全硝化反応)における典型的なモニタリング結果を示した。

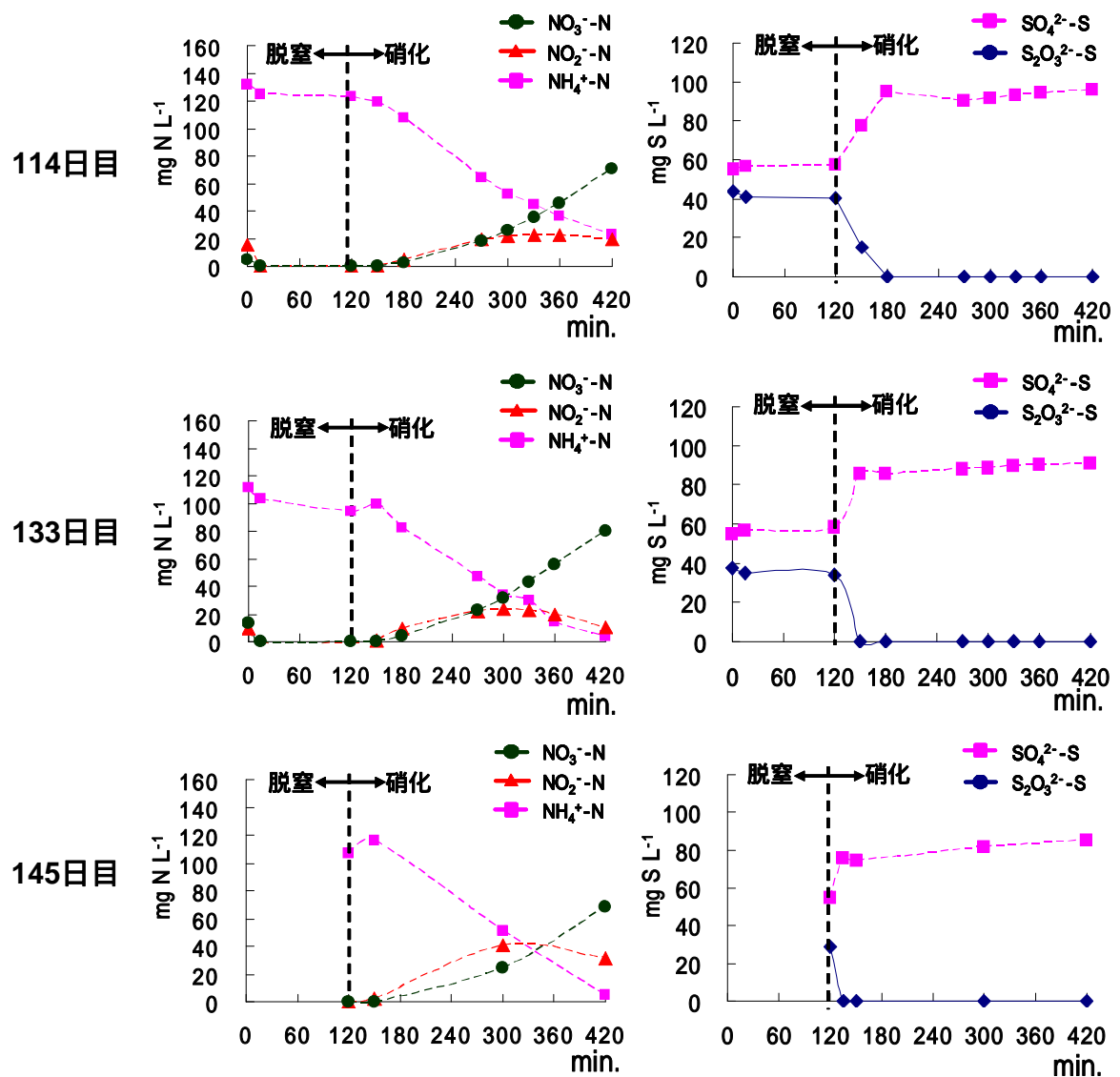


Fig. 4-6a リアクター内溶存態窒素濃度の経時変化; 112-145 日 (pH 変更後, 完全硝化反応-アンモニア酸化活性失活直前) における典型的なモニタリング結果を示した。

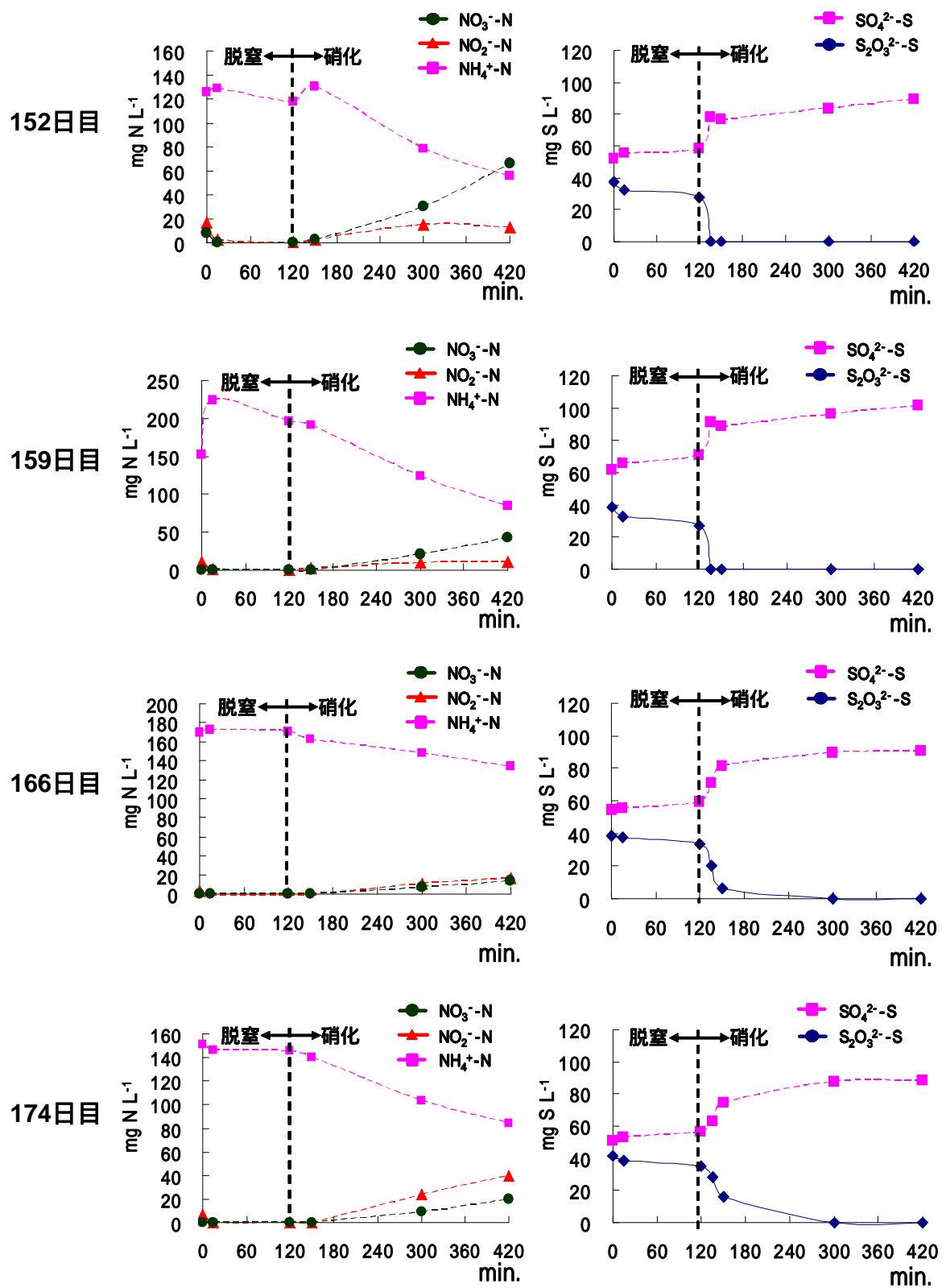


Fig. 4-6b リアクター内溶存態窒素濃度の経時変化; 152-174 日 (pH 変更後, アンモニア酸化活性失活-回復過程) における典型的なモニタリング結果を示した。

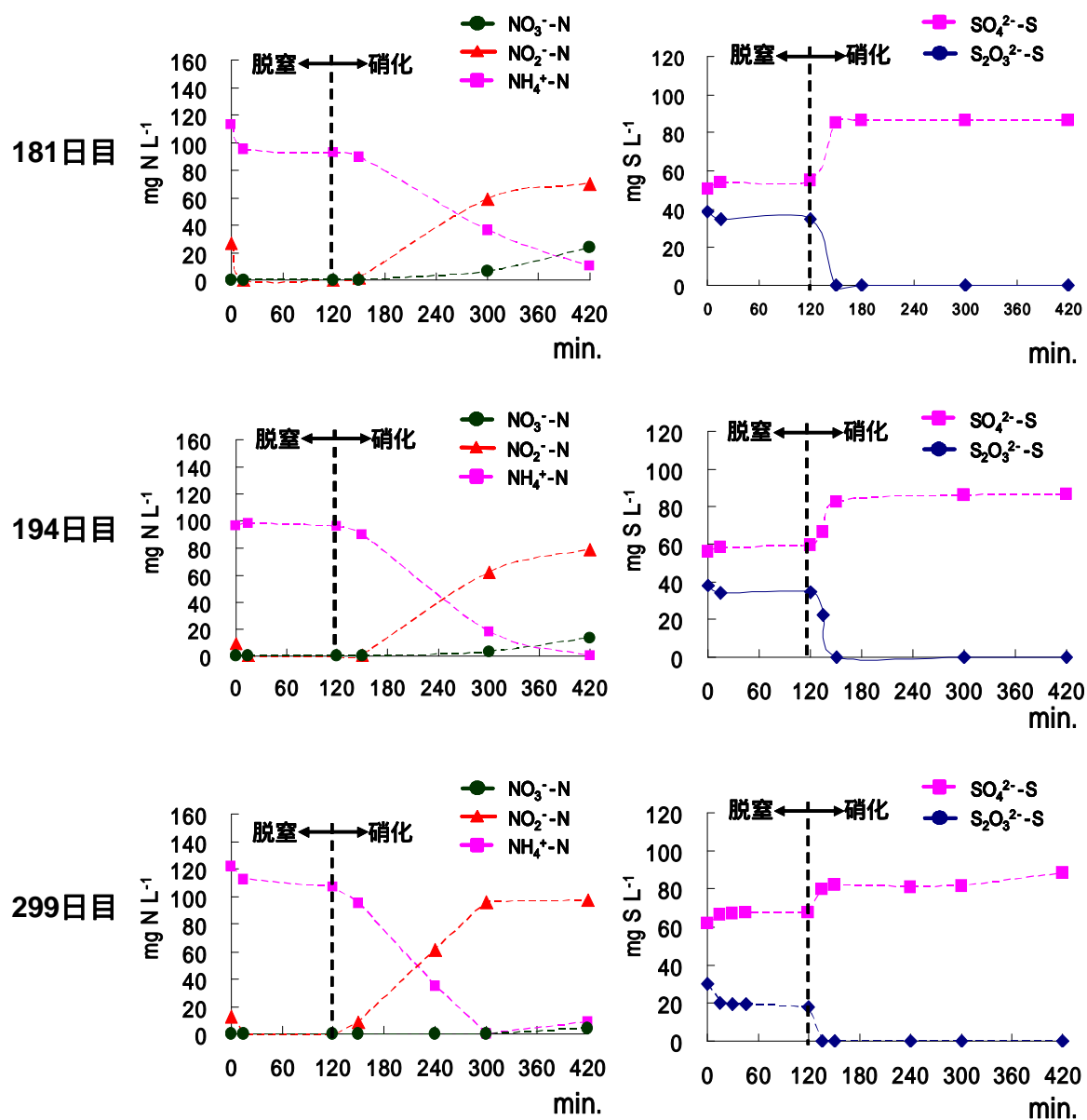


Fig. 4-6c リアクター内溶存態窒素濃度の経時変化; 181-299 日 (pH 変更後, 亜硝酸型硝化反応) における典型的なモニタリング結果を示した。



## 4.2 考察

### 4.2.1 運転条件の変更と処理成績の変化

本リアクターは、新日本製鉄（株）新日本製鉄（株）ミニプラントの運転条件を模倣することで、実験室規模活性汚泥リアクターで亜硝酸型硝化反応を得ることを目的に設計された。しかし、4.1.1 で示したように、運転開始当初は期待していた亜硝酸型硝化反応ではなく、完全硝化反応が観察された（Fig. 4-3）。

運転開始当初の本リアクターと新日本製鉄（株）ミニプラントの運転条件の比較を Table 4-2 に示した。この中で、亜硝酸型硝化反応獲得の成否に関わると考えられる点について以下のように考察した。

#### 処理工程

新日本製鉄（株）ミニプラントは連続式の循環式硝化脱窒法で、本リアクターは硝化工程のみの連続回分式であった。一般に、脱窒過程の導入が亜硝酸酸化細菌（NOB）の生育を抑制する（van Loosdrecht & Jetten, 1998）といわれており、新日本製鉄（株）ミニプラントで起こった亜硝酸型硝化反応には、脱窒工程の存在がひとつの要因となっていた可能性がある。

#### pH

運転当初の本リアクターは pH の制御値を  $\text{pH} > 7.2$  とした。これは、新日本製鉄（株）ミニプラントが運転条件としていた  $\text{pH} = 7.5$  を参考に設定したものであったが、実際には、亜硝酸型硝化反応が観察された時期の新日本製鉄（株）ミニプラントの硝化槽における pH は 7.9-8.6 程度であった。代表的な AOB である *Nitrosomonas* の至適 pH は 8-9 の間であり、代表的な NOB である *Nitrobacter* の至適 pH は 7 弱というのが一般的な見識であり（北尾，2003），高 pH 条件は NOB の選択的な排除に効果があるとされている。このことから、新日本製鉄（株）ミニプラントにおける亜硝酸型硝化反応の一因になっていたと考えることもできる。

pH 制御による亜硝酸蓄積を観察した文献はいくつかあるが、一方でその亜硝酸蓄積は長期間継続し得ないものであるという報告（Ruiz et al., 2003.）もある。Ruiz et al.（2003）は pH 6.45-8.95 でアンモニア態窒素の硝酸態窒素までの完全な硝化を観察し、その範囲外の pH ではアンモニアの酸化自体が起こらない、という結果を得ている。新日鐵新日本製鉄（株）ミニプラントでも亜硝酸蓄積と pH に特別な対応関係は見受けられなかった。

高い pH が、環境中への遊離アンモニア（free ammonia;  $\text{NH}_3$ ）の蓄積を引き起こし硝化を阻害することに着目し、亜硝酸蓄積の実現を試みた報告もある。Bae et al.（2001）は pH 8（ $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{DO} = 1.5\text{mgL}^{-1}$ ）で、Jianlong and Ning（2004）は pH 7.5（ $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{DO} = 1.5\text{mgL}^{-1}$ ）で効率的に亜硝酸蓄積を実現できる free ammonia 濃度が得られたとしている。

## 炭素源

新日本製鉄（株）ミニプラントの流入水は実安水の主成分であるフェノール（およびチオシアン）を COD 成分として含む人工安水であったのに対し、本リアクターでは実験室における取り扱いの困難さから、流入水である合成排水の COD 成分をグルコースと酢酸で代用した。従属栄養微生物による COD の酸化反応と硝化反応の間で起こる酸素の競合による亜硝酸型硝化反応を観察した報告（Hanaki et al., 1990a）があるが、流入 COD 成分の違いによる活性汚泥中従属栄養微生物の酸素要求量の違いが、新日本製鉄（株）ミニプラントと本リアクターとの亜硝酸型硝化反応の成否に関わった可能性もある。

## 塩濃度

高塩濃度条件において亜硝酸型硝化反応を観察した報告はいくつかあり（Catalan-Sakairi 1997, Campos et al 2002, Chen et al 2003, Sanchez et al 2004），新日本製鉄（株）ミニプラント内も、流入する人工安水を 2.5 倍に希釈する海水により高塩濃度の環境に置かれていた。新日本製鉄（株）ミニプラントでは実際の海水を用いていたが、本リアクターでは、標準海水と規定されているもの（淵，1970）を参考に、塩化ナトリウム溶液（14.0g NaCl L<sup>-1</sup>）をもって模擬海水とし、合成排水に混入させた。しかし、実際の海水は多くのミネラルを含んでいるため、NaCl 溶液での代用では不十分であった可能性がある。

以上の考察から、亜硝酸型硝化反応獲得のための最初の試みとして処理工程の変更を行うこととした。運転 75 日目に、硝化工程の前段に脱窒工程を導入した（Table 4-1）。およそ 1 ヶ月間リアクターの水質モニタリング結果に目立った変化が観察されなかったので（Fig.4-5），運転 112 日目に pH の制御値を pH>7.2 から pH>8.0 に変更した（Table 4-1）。

Table 4-2 新日本製鉄（株）ミニプラントと本リアクターの比

|                | 硝化反応  | 処理工程           | 流入COD成分                | HRT   | SRT     | pH      | DO       | temp. | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> consumption |
|----------------|---|----------------|------------------------|-------|---------|---------|----------|-------|---|
| 新日本製鉄（株）ミニプラント | 亜硝酸型硝化<br>(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N) | 循環式硝化脱窒        | phenol<br>(& Thiocyan) | 72 hr | 30 days | 7.9-8.6 | > 2ppm   | 30    | 硝化槽において酸化   |
| 運転開始当初のリアクター   | 完全硝化<br>(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)   | 硝化工程のみの<br>SBR | glucose<br>& acetate   | 16 hr | 20 days | > 7.2   | > 1.7ppm | 30    | 硝化工程において急速に酸化   |

pH 制御値を変更してから 1 ヶ月程度たった後に処理水中へのアンモニア態窒素の蓄積（硝化工程におけるアンモニア酸化活性の失活）が観察され始めた（Fig. 4-6b）。アンモニア酸化活性の失活は運転 166 日目でピークに達したが、その後回復傾向を示し、181 日目にはほぼ完全に回復した。アンモニア酸化活性の回復とともに処理水中への亜硝酸態窒素の蓄積（硝化工程における亜硝酸型硝化反応）が観察されるようになった（Fig. 4-6c）。

本リアクターの SRT (= 20 日) から、運転条件の変更などによるリアクター内活性汚泥群集構造の改変は少なくとも 20 日程度の時間をかけて徐々に起こると推察される。今回水質モニタリング結果にあらわれたアンモニア酸化活性のダイナミックな変動は 1 ヶ月かけて起こった。これはリアクターの SRT から考えて妥当なタイムスケールであり、アンモニア酸化活性の失活は活性汚泥（硝化細菌）群集の変化により起きたことが示唆された。しかし、アンモニア酸化活性の変動が始まったのは pH 変更から 1 ヶ月後のことであり、このタイムラグについての明確な説明は難しい。よって、pH 制御値の変更が亜硝酸型硝化反応の獲得の決定要因であったのかどうかは断言できず、さらに言うならば、pH 制御値変更在先立って行った脱窒工程の導入が亜硝酸型硝化反応の獲得と無関係であったかどうかとも言するのは難しいといえる。

#### 4.2.2 流入水中のチオ硫酸イオンの有無と亜硝酸型硝化反応

本リアクターを構築する際に着目したことの一つに、新日本製鐵（株）新日本製鉄（株）ミニプラントにおいて流入水中にチオ硫酸イオンが存在するときに亜硝酸型硝化反応が観察された、という現象があった（第 2 章）。チオ硫酸による硝化反応の抑制に関する報告は、排水処理の分野よりもむしろ農業の分野において多い。農業では、窒素肥料（ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ）が施肥後に硝化・脱窒によって失われることを防ぐために硝化抑制剤を用いることがあり、硝化抑制剤としてのチオ硫酸の可能性について論じた報告が複数ある（Goos 1985, Janzen & Bettany 1986, Sallade & Sims 1992, Saad et al. 1996）。これらの多くはアンモニア酸化抑制効果の是非に注目している場合が多く、チオ硫酸の亜硝酸酸化に及ぼす影響について言及していないものもあるが、チオ硫酸の添加による土壌中への亜硝酸態蓄積を観察した報告もある（Janzen & Bettany 1986, Saad et al. 1996）。

Fig. 4-6, 4-7, 4-8 に示した溶存態硫黄化合物であるチオ硫酸態硫黄（ $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}\text{-S}$ ）とその酸化物である硫酸態硫黄（ $\text{SO}_4^{2-}\text{-S}$ ）のモニタリング結果から、硝化工程における急速なチオ硫酸の酸化が見て取れる。この傾向は、完全硝化反応を示した時期（0-133 日目）と亜硝酸型硝化反応を示した時期（181-299 日目）に関わらず、運転期間を通じた傾向だといえる。チオ硫酸態窒素の消費（酸化）速度と、チオ硫酸態硫黄の最終酸化物である硫酸態硫黄の生成速度にギャップがあるが、これは「チオ硫酸 テトラチオネート 硫酸」の酸化過程において、「テトラチオネート 硫酸」の酸化反応が律速になったことを示唆していると考えられる。

溶存態硫黄化合物モニタリング結果における興味深い点は、アンモニア酸化の失活-回復が観察された時期にあたる 166 日目および 174 日目の硝化(好気)工程におけるチオ硫酸の酸化速度が通常より小さいことであった。しかし、この現象と完全硝化型から亜硝酸型への硝化反応の変化との関係の有無を見出すまでには至らなかった。

### 4.3 まとめ

---

運転開始当初、意に反して完全硝化反応を示していた実験室規模活性汚泥リアクターにおいて、2度の運転条件の変更の末に、亜硝酸型硝化反応を獲得することができた。亜硝酸型硝化反応は、最初の運転条件変更（硝化工程前段への脱窒工程の導入）からおよそ2ヶ月後、2度目の運転条件変更（pH制御値の上方修正）からおよそ1ヶ月後の運転150日目頃から観察されたアンモニア酸化活性のダイナミックな変動の後に、獲得された。だが、2度の運転条件変更からアンモニア酸化活性の変動、あるいは亜硝酸型硝化反応の獲得までの数ヶ月もの時間差を説明することは困難であり、何がきっかけで一連の現象が起こったのかは明確にはできなかった。また、研究開始当初注目していたチオ硫酸の亜硝酸型硝化反応への寄与を評価するには至らなかった。

一つひとつの運転条件と亜硝酸型硝化反応との関連性を見出すことは困難であったが、本章における一連の実験結果は、亜硝酸型硝化反応が単一ではない複数（pH、温度、嫌気好気条件、etc.）の条件が揃ったときに安定して起こる現象であることを示唆しているともいえる。

## 第5章 硝化細菌群集解析

第4章において構築された実験室規模活性汚泥リアクターにおける硝化細菌群集の解析を行った。第4章ではリアクターの水質モニタリングによって、完全硝化反応 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$   $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) を示していた活性汚泥が亜硝酸型硝化反応 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$   $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) を示すようになるまでの遷移過程を捉えることができた。本章では、この遷移過程における硝化細菌群集の挙動を解析することで、亜硝酸型硝化反応制御に向けた微生物学的な知見を得ることを目的とした。

硝化細菌群集解析は、リアクター活性汚泥内のアンモニア酸化細菌 (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB) と亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) に対する存在量および存在属・存在種の評価を分子生物学的手法により行った。具体的には、FISH による存在 NOB 属の同定、QPrimer-PCR による AOB or NOB 由来 DNA コピー数の定量、PCR-Cloning-Sequencing による存在 AOB or NOB 種の同定、PCR-TRFLP による AOB 種構成変化の追跡を行った (Fig. 5-1)。

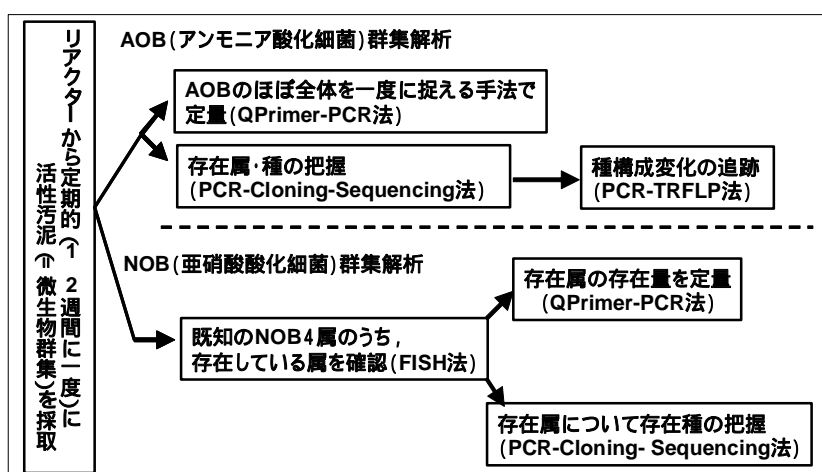


Fig. 5-1 硝化細菌群集解析のフロー

## 5.1 *amoA* を標的としたアンモニア酸化細菌 (AOB) 群集解析結果

---

第4章において、実験室規模活性汚泥リアクターで安定的な亜硝酸型硝化反応が観察される直前に、アンモニア酸化活性の失活・回復というダイナミックな変動が認められた。このアンモニア酸化活性の変動は、アンモニア酸化反応の主役である AOB の動態にも何らかの変化があったことを示唆している。

本研究における AOB 解析は、*Betaproteobacteria* に属する AOB (betaproteobacterial AOB ;  $\beta$ -AOB) が有するタンパク質 ammonia monooxygenase subunit A (AmoA) をコードする機能遺伝子 *amoA* を標的として設計された *amoA*-1F, *amoA*-2R primer set (Rotthauwe et al., 1997) を用いて行った (第3章)。*amoA* を標的にすることで、16S rDNA を標的にした場合よりも特異的に AOB を捉えられることを期待した。また、数ある既知の細菌の機能遺伝子の中でも *amoA* 塩基配列のデータベースは充実しており、得られた *amoA* 配列から近縁種を求めることは十分可能であると考えられている (Purkhold et al. 2000, Aakra et al. 2001, Purkhold et al. 2003)。

以下に本研究における AOB 解析結果を示した。各手法の詳細については第2章および第3章を参照されたい。

### 5.1.1 QPrimer-PCR による $\beta$ -AOB 由来 *amoA* の定量

標的とした DNA 配列のコピー数を求めることのできる定量的 PCR 法の一手法である、QPrimer-PCR により、リアクター運転期間中の  $\beta$ -AOB 由来 *amoA* の増減を追った。各サンプルにつき3反復の測定を行い、その平均値 (mean) と標準偏差 (standard deviation; SD) を求めた (Fig. 5-2)。

*amoA* コピー数は、リアクター運転開始から30日目程度まで増加傾向を示したのち、 $10^7$  copies/1ml mixed liquor 程度に保たれた。pH 制御値を pH>7.5 から pH>8.0 に変更したのちの112日目以降増加傾向を示し133日目には運転期間中最も大きなコピー数  $10^{7.46}$  copies/1ml mixed liquor を示したが、その後223日目まで減少傾向を示した。223日目以降は一転して増加傾向を示し、257-299日目には比較的高い  $10^{7.34-7.45}$  copies/1ml mixed liquor を維持した。

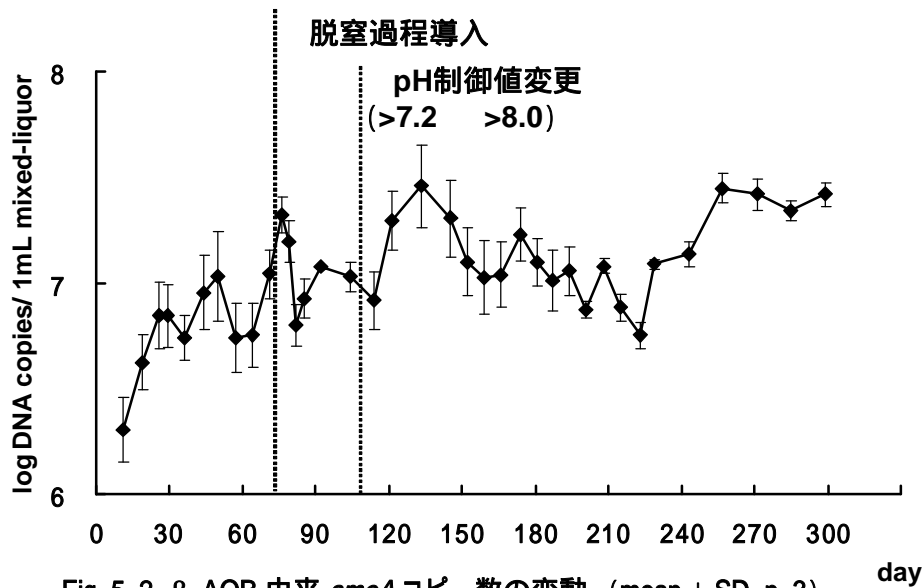


Fig. 5-2  $\beta$ -AOB 由来 *amoA* コピー数の変動 (mean  $\pm$  SD, n=3)

### 5.1.2 PCR-Cloning-Sequencing による $\beta$ -AOB 由来 *amoA* 系統樹の作成

実験室規模活性汚泥リアクター（第4章）において完全硝化反応を示した92日目の活性汚泥と、亜硝酸型硝化反応を示した257日目の活性汚泥に存在する $\beta$ -AOBの種構成を把握するために *amoA*-1F, *amoA*-2R primer set を用いた PCR-Cloning-Sequencing を行った。92日目と257日目の汚泥からそれぞれ40個のクローンを得た。

得られた計80のクローンが有する *amoA* 塩基配列をアミノ酸配列 (AmoA) に翻訳したものを系統樹上に示した (Fig.5-3)。 *amoA* から AmoA への翻訳および系統樹作成には Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver. 3.1 (MEGA 3.1) を用いた。系統樹は Neighbor-Joining 法で作成し, Bootstrap は1000回行った。

92日目（完全硝化型）の汚泥から得られた40クローン全てが *Nitrosococcus mobilis* に近縁であり (OUT 1), 257日目（亜硝酸型）の汚泥から得られた40クローン中28クローンが *Nitrosococcus mobilis* に (OUT 1), 12クローンが *Nitrosomonas eutropha* に近縁 (OUT 2) であった (Fig.5-3)。このことから, 亜硝酸型 (257日目) の活性汚泥では, 完全硝化型 (92日目) の活性汚泥と汚泥からは検出されなかった $\beta$ -AOB 種が高頻度で出現したことが示された。

完全硝化反応が観察された時期にも亜硝酸型硝化反応を行っていた時期においても存在が検出された AOB 種 (Fig. 5-3 における OTU 1) は, *Nitrosomonas europaea*/*Nitrosococcus mobilis* Lineage と表現されるグループ (Purkhold et al. 2000, Koops et al 2003) における代表的な株であり, 塩耐性あるいは好塩性を示す。*Nitrosococcus mobilis* はその球状の形態から “*Nitrosococcus*” という属名がつけられているが, Gammaproteobacteria に属する

*Nitrosococcus oceani* などとは異なり，系統学的には Betaproteobacteria に分類される *Nitrosomonas europaea* と近縁であり，*Nitrosomonas mobilis* と表現される場合もある。*N. mobilis* は Koops et al. (1976) により北海から，Juretschko et al. (1998) によって工業排水処理プラントから単離培養された。生育には高塩環境が必要であり，高栄養の水圏を好むと考えられている (Koops et al 2003)。グリコーゲン顆粒，ルビスコ(RuBP carboxylase/oxydase)の結晶化部位であるカルボキシソーム(carboxysome)は細胞内に観察されない。

亜硝酸型硝化反応が観察された時期において出現した OTU 2 (Fig. 5-3) であらわされた AOB 種は，*Nitrosomonas eutropha* に近縁であった。*N. eutropha* も，前述の *N. mobilis* や *Nitrosomonas* sp. Nm104 と同様に *Nitrosomonas europaea/Nitrosococcus mobilis* Lineage にグループ分けされる (Purkhold et al. 2000, Koops et al 2003)。一つの細胞あるいは短い鎖状になった細胞として表れ，桿状あるいは“洋ナシ”状 (pear-shape) などの多形態を示し (Koops et al. 1991)，*N. mobilis* と異なり，カルボキシソームが細胞内に観察される。高栄養環境において頻繁に観察され，生育には塩を必要としないが塩耐性をもち，400 mM NaCl の環境においても生育可能である。



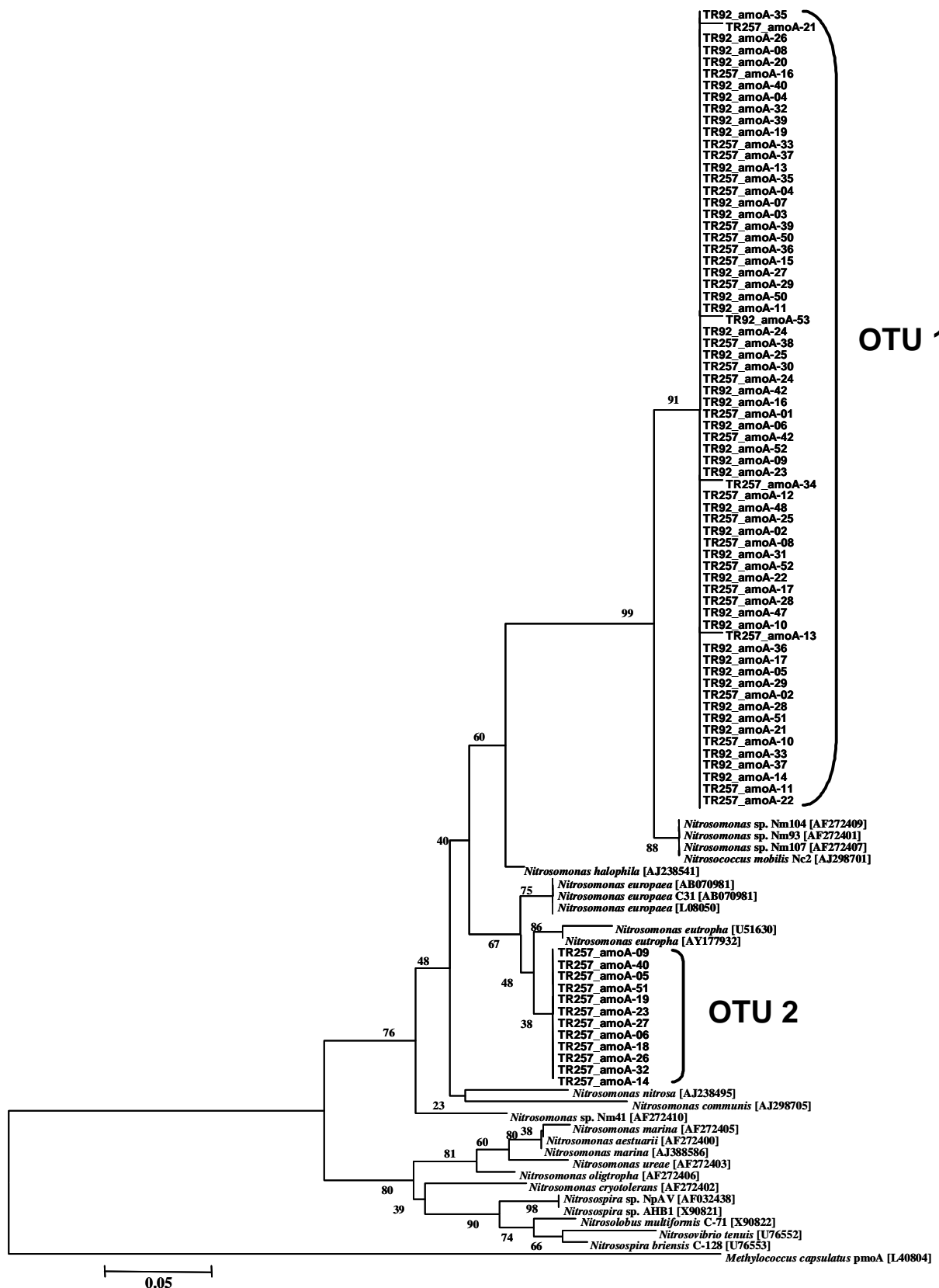


Fig. 5-3 AmoA 系統樹 (Neighbor-Joining 法) ; "TR92\_amoA-#" は 92 日目の活性汚泥から得られたクローン , "TR257\_amoA-#" は 257 日目の活性汚泥から得られたクローン. OTU 1 には 92, 257 日目双方のクローンが存在するが , OTU 2 は 257 日目のクローンのみからなる .

### 5.1.3 PCR-TRFLP による $\beta$ -AOB 種構成変化の追跡

PCR-Cloning-Sequencing により、92 日目の活性汚泥と 257 日目の活性汚泥における $\beta$ -AOB 種構成は異なることが示された (5.1.2)。 $\beta$ -AOB 種構成の変化がリアクター運転期間中どのタイミングで起こったのかを検証するため、57, 92, 133, 145, 159, 166, 174, 181, 194, 257, 299 日目の活性汚泥から抽出した DNA に対し、forward 側の 5'末端を 6-Fam で蛍光標識した *amoA*-1F-2R primer set と制限酵素 *Mbo* を用いた PCR-TRFLP を行った。本実験条件では、Fig. 5-3 に示した OTU 1 は 77 bp、OTU 2 は 192 bp の塩基長として検出された。

TRFLP の結果を Fig. 5-4 に示した。40 bp 以下に検出されたピークは、非結合プライマーやプライマーダイマーの残渣であると思われる。57 日目から 174 日目のサンプルからは 77 bp に大きなピークが検出され、181 日目以降から 192 bp のピークがはっきりと検出されはじめた。このことから、 $\beta$ -AOB の種構成変化が現れたのはアンモニア酸化活性が回復を始めた 181 日目ごろと推察された。

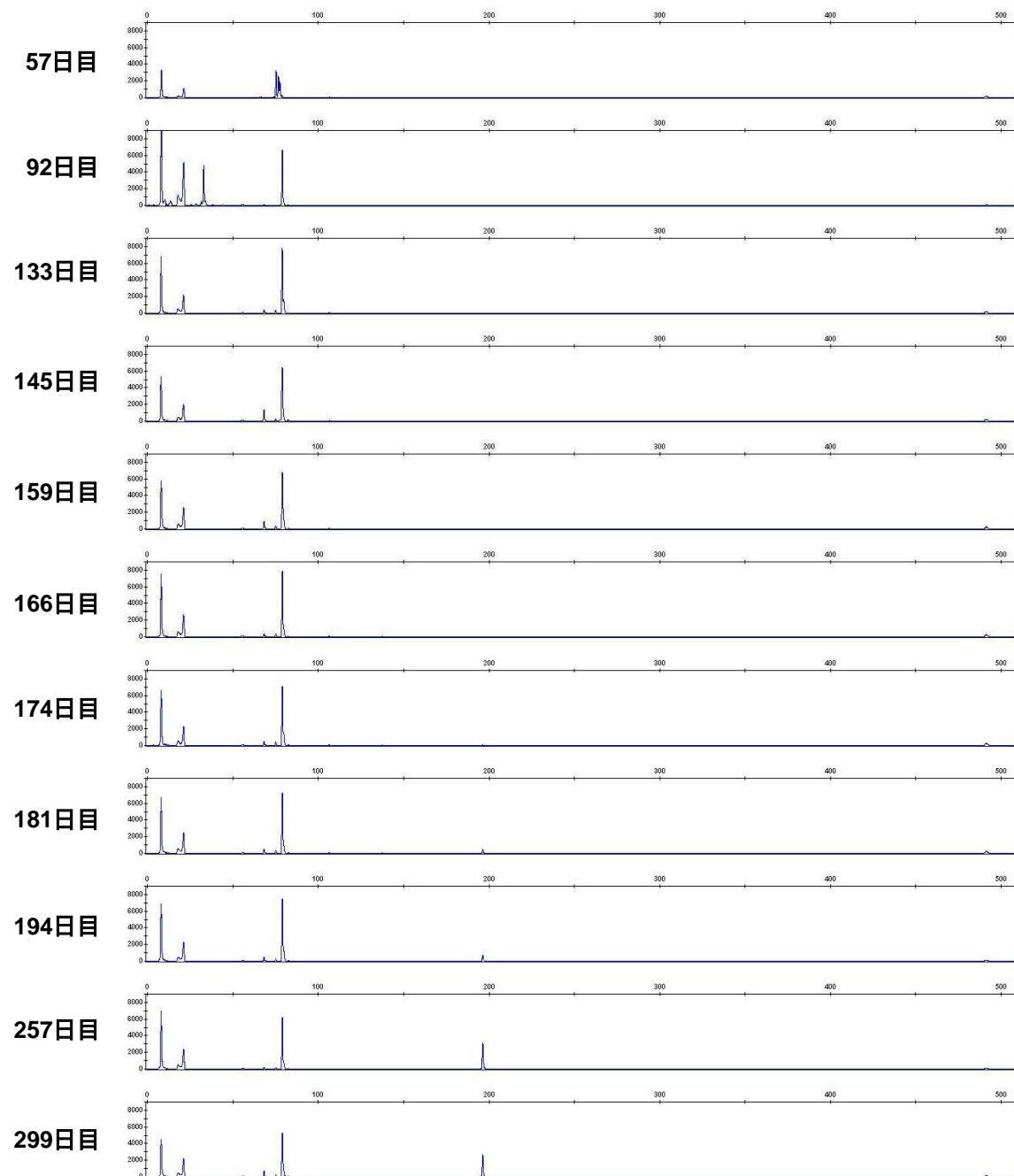


Fig. 5-4 *amoA*を標的とした PCR-TRFLP; Fig. 5-3 における OTU 1 は 77 bp のピークで, OTU 2 は 192 bp のピークであられる.

## 5.2 亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) 群集解析結果

---

亜硝酸型硝化反応は、アンモニア酸化細菌 (AOB) の活性が維持された状態で亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活性が抑制されたときに起こると考えられる。実験室規模活性汚泥リアクターにおいて観察された、完全硝化反応を行っていた活性汚泥が亜硝酸型硝化反応を行うまでの遷移過程 (第4章) における NOB の挙動解析は、すなわち、本リアクターで観察された亜硝酸型硝化反応が亜硝酸型硝化反応の鍵と考えられている NOB の存在量変化や構造変化によって説明されるものであるかどうかを検証することを意味する。

現在までに知られている NOB は系統発生的に多様であり、Proteobacteria の複数の subdivision に現れる。既知の NOB 属のうち *Nitrobacter* 属は Alpha-proteobacteria に、*Nitrococcus* は Gamma-proteobacteria に、*Nitrospina* 属は Delta-proteobacteria にそれぞれ分類される。*Nitrospira* 属は、系統発生的に NOB でない *Leptospirillum ferrooxidans* のような細菌と関係があり、Proteobacteria とは異なるグループを形成する。このように NOB は系統学的に散在しているために、NOB を広く一度に捉えられるような分子生物学的解析ツールの発展は AOB を標的としたそれに比べて遅れをとっている。

第4章で構築したリアクターにおける NOB の挙動を追跡するためには、まずリアクター内に優占する NOB を属レベル以下で把握する必要がある。優占 NOB を決定した上で、その属に特異的な oligonucleotide primer あるいは probe を用いた解析を行うことが求められる。

本研究では、NOB 各属に特異的な probe を用いた FISH を行い、優占 NOB 属を把握した上でその属に対して定量・定性解析を行った (Fig. 5-1)。

### 5.2.1 FISH による優占 NOB 属の同定

亜硝酸酸化活性が活発であった 8 日目の活性汚泥に対して, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* の 4 属それぞれに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH (Florescence *in situ* Hybridization) を行い, リアクター内に優占する NOB を同定したところ *Nitrobacter* 属に特異的な NIT3 のみにおいて蛍光が検出された( Table 5-1 ,Fig. 5-5 )。よって, 本リアクターでは *Nitrobacter* 属が優占 NOB であることが示唆された。

Table 5-1 NOB を標的とした既存の probe による FISH;  
亜硝酸型硝化反応が活発であった 8 日目の活性汚泥に対して行った。

| Probe    | Specificity                | Signal |
|----------|----------------------------|--------|
| NIT3     | <i>Nitrobacter</i> spp.    | +      |
| Ntspa662 | genus <i>Nitrospira</i>    | -      |
| Ntspn693 | <i>Nitrospina gracilis</i> | -      |
| Ntcoc84  | <i>Nitrococcus mobilis</i> | -      |

(+: 蛍光検出, -: 蛍光検出できず)

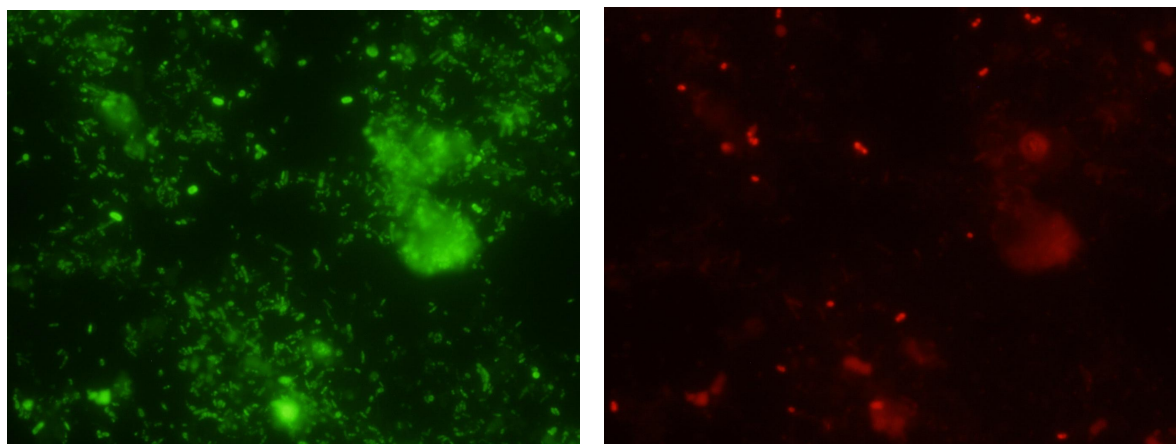


Fig. 5-5 FISHによる *Nitrobacter* の検出; EUB-mix(FITC) による真正細菌の検出(左)と, 同視野における NIT3(Cy3)による *Nitrobacter* の検出(右)。

### 5.2.2 QPrimer-PCR による *Nitrobacter* 由来 16S rDNA コピー数の定量

5.2.1 で本リアクター内の優占 NOB であると決定された *Nitrobacter* 俗に由来する 16S rDNA コピー数の運転期間中における変動を求めた。DNA コピー数の定量には、定量的 PCR 法の一手法である QPrimer-PCR により行った。各サンプルにつき 3 反復の測定を行い、その平均値(mean)と標準偏差(standard deviation; SD)を求めた(Fig. 5-6)。Navarro et al.(1992)によると *Nitrobacter* は 1 細胞あたり 1 つの 16S rRNA オペロンを持つ。よって、QPrimer-PCR で求められた 16S rDNA コピー数がすなわち *Nitrobacter* の細胞数であると考えられる。

*Nitrobacter* 俗に由来する 16S rDNA コピー数は、運転開始から 79 日目まで増加傾向を示し、その後  $10^6$  copies/1ml mixed liquor まで減少し 159 日目までその状態を維持したのち、漸減傾向を示した。201-208 日目にコピー数の急減が観察され、208 日目以降は  $10^5$  copies/1ml mixed liquor 未満で安定した。

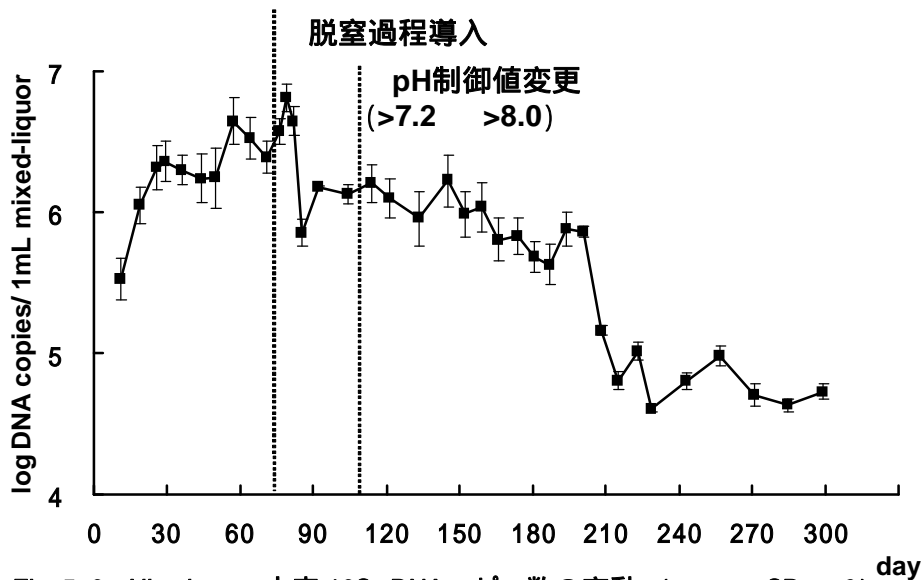


Fig. 5-6 *Nitrobacter* 由来 16S rDNA コピー数の変動 (mean ± SD, n=3)

### 5.2.3 PCR-Cloning-Sequencing による *Nitrobacter* 存在種の同定

実験室規模活性汚泥リアクター（第4章）において完全硝化反応を示した 92 日目の活性汚泥に存在する NOB の種構成を把握するために PCR-Cloning-Sequencing を行った。5.2.1 により、本リアクター内の優占 NOB は *Nitrobacter* であると決定されたことを踏まえ、に特異的な primer である FGPS872f-1269r primer set を用いた。

得られた 20 のクローンが有する *Nitrobacter* 16S rDNA 塩基配列 (351 bp) を系統樹上に示した(Fig.5-7)。系統樹作成には Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver. 3.1 (MEGA 3.1) を用いた。系統樹は Neighbor-Joining 法で作成し、Bootstrap は 1000 回行った。

92 日目（完全硝化型）の汚泥から得られた 20 クローン全てが *Nitrobacter alkalicus* AN1, *Nitrobacter alkalicus* AN2, *Nitrobacter alkalicus* AN4, *Nitrobacter wingradskyi* Nb-255 と 99-100% (349-351/351 [bp]) 相同であった。

*Nitrobacter* 種間の 16S rDNA 塩基配列は非常に似通っており (Orso et al. 1994), 351 bp という短い配列を用いた解析によって最近縁種を断定することは難しい。しかし, 本研究で構築したリアクターの塩濃度が高いことと, *N. alkalicus* が高塩環境にある湖や土壌から分離されたことを加味するならば, 既知の *Nitrobacter* 種のうち得られたクローンと最も近縁な種は *N. alkalicus* である可能性が高いといえる。

*N. alkalicus* の pH の適応範囲は pH 6.5-10.2 と広く (Sorokin et al. 1998) 細胞は *Nitrobacter* 属に特徴的な形態, すなわち pear-shape を示す。一方, 他の *Nitrobacter* 種とは対照的に, 細胞内にカルボキシソームが確認できない (Sorokin et al. 1998)。また, Sorokin et al. (1998) らによる培養実験では, 倍加時間 = 18 時間が得られ, これは淡水性の *Nitrobacter* 種よりも生育速度が大きいと考えられるが, 培地中に有機炭素基質を混合すると生育阻害が観察されたと報告されている。

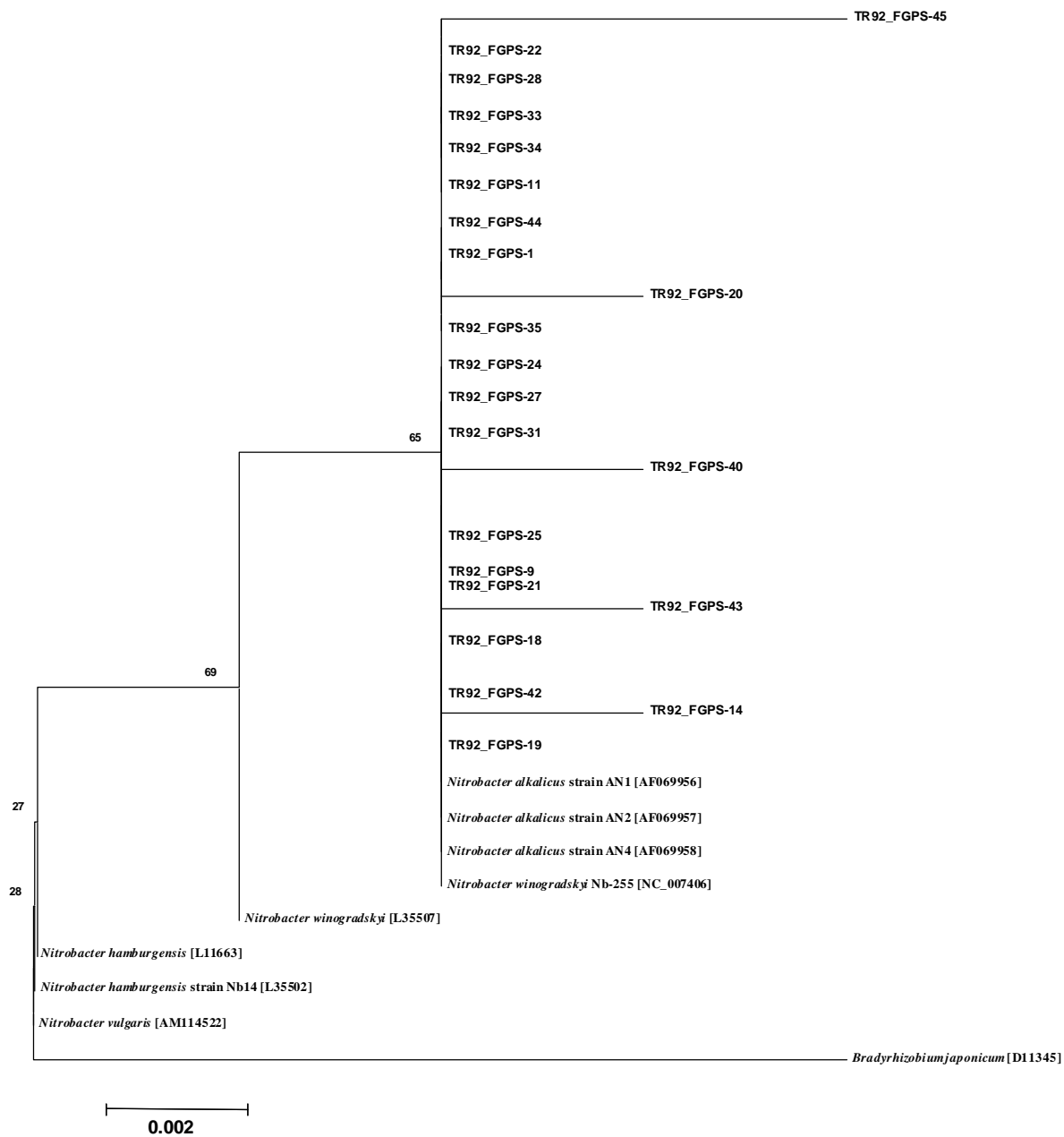


Fig. 5-7 *Nitrobacter* 16S rDNA 系統樹 (Neighbor-Joining 法) ; "TR92\_FGPS-#"が92 日目のリアクター活性汚泥から得られたクローン .



## 5.3 考察

### 5.3.1 リアクター処理水質の変動と硝化細菌由来 DNA コピー数の変動

5.1.1 および 5.2.2 によって得られたリアクター運転期間中の AOB および NOB 由来 DNA コピー数と、第 4 章 4.2.1 で得られたリアクター処理水質の変動を Fig. 5-8 にまとめた。

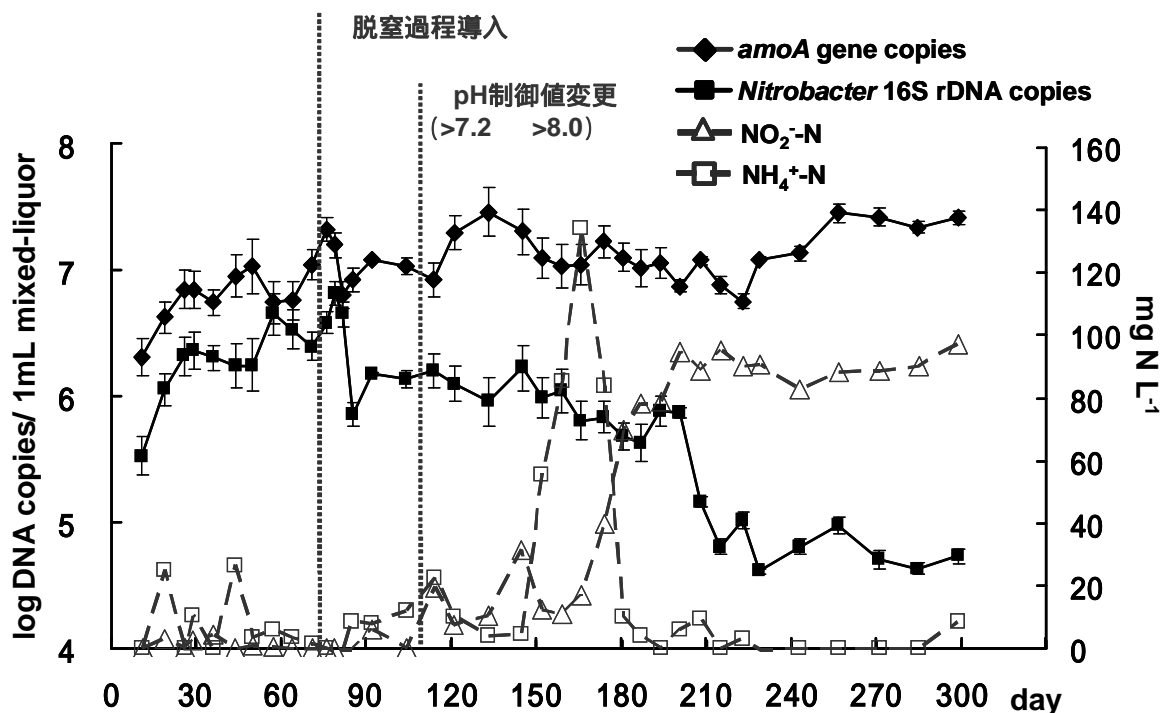


Fig. 5-7 リアクター処理水中アンモニア態窒素( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )および亜硝酸態窒素濃度( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )と  $\beta$ -AOB 由来 *amoA* および *Nitrobacter* 由来 16S rDNA コピー数 (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ) の変動

*Nitrobacter* 16S rDNA コピー数は 159 日目までは  $10^6$  copies/ 1mL mixed liquor 程度を維持したが、リアクター処理水中にアンモニア態窒素が蓄積するのと時期を同じくして漸減傾向を示し、処理水中の高濃度の亜硝酸態窒素蓄積に少し遅れるようにして  $10^5$  copies/ 1mL mixed liquor 以下まで減少し、亜硝酸型硝化反応との関連性を示唆した。

*amoA* コピー数は、5.1.1 で述べたように細かな変動を示したが、*Nitrobacter* 16S rDNA コピー数のような大きな変動はみられなかった。処理水中へアンモニア態窒素が蓄積しはじめる直前から処理水中アンモニア態窒素が最大になるまで (133-166 日目) において、*amoA* コピー数が漸減しているが、その変動はアンモニア酸化活性が安定している時期と比べて特に大きなものではないといえる。

### 5.3.2 亜硝酸酸化速度と *Nitrobacter* 数の変動

リアクターの水質モニタリングから得られた亜硝酸酸化活性（第4章）と QPrimer-PCR によって得られた *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数（本章 5.2.2）から，本活性汚泥リアクターで観察された亜硝酸型硝化反応が *Nitrobacter* 由来の DNA コピー数で説明することができるか検証した。

*Nitrobacter* 16S rDNA コピー数の変動が著しい時期（増減が激しい時期）および，コピー数が安定している時期（完全硝化型の安定期，亜硝酸型の安定期）における，実験値から求められた単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性（硝酸生成速度）を算出し，得られたそれぞれの値を比較することをもって，検証とした。

また，既往の研究から算出された *Nitrobacter* の亜硝酸酸化活性と，本研究が示した亜硝酸酸化活性の比較も行った。

#### (1) コピー数変動期およびコピー数安定期における単位 *Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化活性

リアクターにおける水質モニタリング結果および QPrimer-PCR 結果（Fig. 5-8）を用い，Fig. 5-8 に示した各時期における単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性を求めた。Fig. 5-8 に示した時期はすべて，*Nitrobacter* への亜硝酸態窒素供給が十分であると考えられる時期である。また，示した硝酸生成速度のデータは巻末の付録に掲載したので参照されたい。

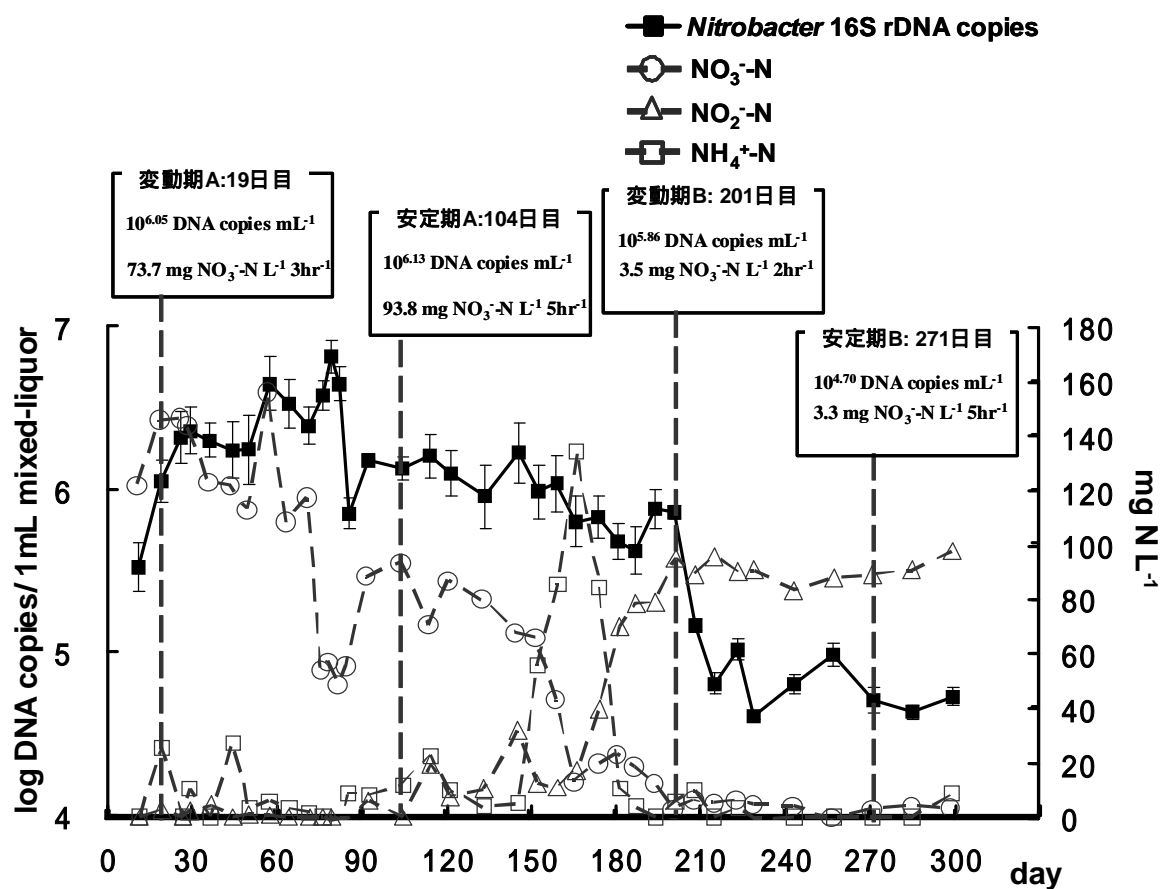


Fig. 5-8 リアクター処理水中硝酸態窒素濃度( $\text{NO}_3^-$ -N)と  
*Nitrobacter*由来 16S rDNA コピー数 (mean  $\pm$  SD, n=3) の変動

(i) 計算に用いた前提

a. 亜硝酸酸化速度

硝酸生成速度をもって亜硝酸酸化活性とした。硝酸生成速度は、リアクター水質モニタリングによる実験値(第5章)を用いた。

b. *Nitrobacter* 1細胞が有する 16S rDNA コピー数

1つの細胞が有する 16S rRNA のオペロン数は種によって様々であるが(Klappenbach et al., 2001), Navarro et al. (1992) は, *Nitrobacter* は 1細胞あたり 1つの 16S rRNA オペロンを持つとした。よって, QPrimer-PCR で実験的に求められた 16S rDNA コピー数がすなわち *Nitrobacter* の細胞数とした。

c. *Nitrobacter* の細胞の大きさと乾重

本章 6.2.3 において, 本リアクターに存在する *Nitrobacter* 種は一様であり, 塩基配列が決定された 351 bp において *Nitrobacter Alkalicus* AN1 と 100% 相同であった。Sorokin et al. (1998) は *Nitrobacter Alkalicus* AN1 の細胞の大きさを  $0.6-0.9 \times 1.2-1.8 \mu\text{m}$  として

いる。この数値から細胞の体積を概算すると、

$$N. alkalicus \text{ の体積} = (0.75 \mu\text{m}/2)^2 \cdot \pi \cdot 1.5 \mu\text{m} = 6.62 \times 10^{-13} \text{ cm}^3/\text{cell} \quad (\text{式 6.1})$$

となる。

また、細胞の湿重を体積  $1 \text{ cm}^3$  あたり  $1000 \text{ mg}$  とすると、*N. alkalicus* の湿重は

$$N. alkalicus \text{ の湿重} = 6.62 \times 10^{-10} \text{ mg / cell} \quad (\text{式 6.2})$$

である。細胞の含水率を、典型的な細胞の含水率である 70% (Neidhardt et al. 1990) と仮定すると、*N. alkalicus* の乾重は

$$N. alkalicus \text{ の乾重} = 1.99 \times 10^{-10} \text{ mg / cell} \quad (\text{式 6.3})$$

となる。

以上を用いて、以降の計算を行った。

(ii) 本研究における単位 *Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化活性(硝酸生成速度)の算出法

Fig. 5-8 に示した、19 日目(変動期 A)における単位 *Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化(硝酸生成)速度の算出を例にして以下に示す。

19 日目のリアクターにおける硝酸生成速度は  $73.7 \text{ mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1} \text{ 3hr}^{-1}$  であり、*Nitrobacter* 細胞数 (=16S rDNA コピー数) は、 $10^{6.05} \text{ cell mL}^{-1}$  であった (Fig. 5-8)。よって、単位細胞数あたりの硝酸生成速度は、

$$\begin{aligned} Nitrobacter_{19 \text{ 日目}} \text{ 硝酸生成速度} &= (73.7 \cdot 24/3) \div (10^{6.05} \cdot 10^3) \\ &= 5.25 \times 10^{-7} \text{ mg NO}_3^- \text{-N / cell / day} \quad (\text{式 6.4}) \end{aligned}$$

となる。

また、式 6.3 より単位細胞乾重あたりの硝酸生成速度は、

$$\begin{aligned} Nitrobacter_{104 \text{ 日目}} \text{ 硝酸生成速度} &= (5.25 \times 10^{-7}) \div (1.99 \times 10^{-10}) \\ &= 2.64 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 6.5}) \end{aligned}$$

となる。

同様の計算により，他の時期における単位 *Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化（硝酸生成）速度を算出した。

(iii) コピー数変動期およびコピー数安定期における単位 *Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化活性

前述（ii）の方法により，Fig. 5-8 に示した各時期の単位 *Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化活性（硝酸生成速度）を算出した。結果を以下に示す。

コピー数変動期における単位 *Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化活性

a) コピー数増大期（Fig. 5-8 変動期 A）

$$Nitrobacter_{19 \text{ 日目}} \text{硝酸生成速度} = 2.64 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day (式 6.6)}$$

b) コピー数減少期（Fig. 5-8 変動期 B）

$$Nitrobacter_{201 \text{ 日目}} \text{硝酸生成速度} = 2.71 \times 10^2 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day (式 6.7)}$$

コピー数安定期における単位 *Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化活性

a) 完全硝化型安定期（Fig. 5-8 安定期 A）

$$Nitrobacter_{104 \text{ 日目}} \text{硝酸生成速度} = 1.68 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day (式 6.8)}$$

b) 亜硝酸型安定期（Fig. 5-8 安定期 B）

$$Nitrobacter_{271 \text{ 日目}} \text{硝酸生成速度} = 1.59 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / dry weight / day (式 6.9)}$$

式 6.8, 6.9 より，*Nitrobacter* 16S rDNA コピー数が安定している時期では，硝化反応が完全硝化型であれ亜硝酸型であれ，単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性に違いは見られなかった。一方，コピー数が増大している時期には，安定期のおよそ 1.6 倍の亜硝酸酸化活性が示唆された（式 6.6）。また，コピー数が減少傾向にあるときは，増大期の 10 分の 1 程度の亜硝酸酸化活性が算出された。

## (2) *Nitrobacter alkalicus* AN1 における亜硝酸酸化速度の文献値

Sorokin et al. (1998) は，*Nitrobacter alkalicus* AN1 の純粋培養系（0.2M NaCl, pH 8）を用いた回分実験により，500 nmol O<sub>2</sub> / mg protein / min. 程度の酸素が亜硝酸酸化により消費されるという結果を得た。1 mol の O<sub>2</sub> 消費により亜硝酸から 2 mol の硝酸が生成されることから，

$$\begin{aligned} Nitrobacter_{\text{Sorokin}} \text{の硝酸生成速度} &= 500 \times 2 \text{ nmol NO}_3^- \text{ / mg protein / min} \\ &= 2.02 \times 10^4 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg protein / day} \quad (\text{式 6.10}) \end{aligned}$$

であった。

タンパク質が細胞乾重に占める割合を 52.4% (w/w) とすると (Stouthamer, 1973), 細胞乾重あたりの硝酸生成速度は,

$$\begin{aligned} \text{Nitrobacter}_{\text{sorokin}} \text{ の硝酸生成速度} &= (2.02 \times 10^4) \times (0.524) \\ &= 1.05 \times 10^4 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / dry weight / day} \quad (\text{式 6.11}) \end{aligned}$$

以上, 文献値から得られた単位 *Nitrobacter alkalicus* あたりの亜硝酸酸化活性は, 本研究で構築したリアクターにおける *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数増大期の亜硝酸酸化活性の 4 倍程度であった (式 6.6, 6.11)。

### (3) まとめ

(1), (2) で得られた結果についてまとめる。

式 6.7, 6.8 より, *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数が安定している時期では, 硝化反応が完全硝化型であれ亜硝酸型であれ, 算出された単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性に違いは見られなかった。また, *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数に変動が見られるような時期では, コピー数の変動と算出された亜硝酸型硝化活性に整合性が見られた (式 6.6, 6.7)。つまり, 本リアクターにおいて観察された亜硝酸型硝化反応は, 単位 *Nitrobacter* あたりの活性低下 (式 6.7) を発端に起き, その維持は *Nitrobacter* の細胞数 (QPrimer-PCR によって検出された 16S rDNA コピー数) の減少によるものであると説明できるものであった。また, コピー数安定期から算出された亜硝酸酸化活性 (式 6.8, 6.9) は本リアクター内に存在する *Nitrobacter* 種がそのバイオマスを一定量に維持する (増減しない) 大きさであるともいえる。しかし, 亜硝酸型硝化反応が起きた時期は, リアクター内に亜硝酸が高濃度に供給・蓄積された, 基質が十分存在した時期と言い換えることもできる。高濃度の亜硝酸は NOB の活性を阻害することがいわれているが (Anthonisen et al. 1976), 本リアクターでは細胞あたりの活性をある程度維持できており, それにもかかわらず細胞数の増殖が起こらない点に多少の疑問が残る。このことは, あるいは NOB の生息域となっているマイクロサイトでの酸素や亜硝酸の供給量とバルク中におけるそれらの濃度の間の隔たりによって説明され得るかもしれない。

また, 式 6.11 で示した, 本リアクターに存在する *Nitrobacter* と高い相同性 (決定された 351 bp の塩基配列が 100% 相同) を示した *Nitrobacter alkalicus* AN1 の純菌株を用いた実験値 (Sorokin et al. 1998) から求められた活性は, 本リアクターにおけるコピー数増大期 (式 6.6) よりも 4 倍程度大きかった。この差を大きいとみるか小さいとみるかは判断の難しいところではある。Sorokin et al. (1998) は, *N. alkalicus* は有機基質が存在する混合培養系でその活性を著しく減少させると述べた。よって, 純粋培養系で観察された式 6.11 に対し, 本研究 (従属栄養微生物との混合系) から得られた値が小さかったこ

とは妥当な結果であったといえる。

### 5.3.3 リアクター処理水質の変動と AOB 種構成変化

リアクター運転 152-181 日目において、リアクターのアンモニア酸化活性が失活し処理水中に高濃度のアンモニア態窒素が観察されたが、それにもかかわらず、リアクター内に存在するβ-AOB *amoA* コピー数に目立った変動はみられなかった (5.3.1)。1 つの細胞が有する *amo* オペロン数は種によって様々であり、例えば *Nitrosomonas europaea* や *Nitrosospira tenuis* では 2, *Nitrosomonas cryotolerance* や *Nitrosospira briensis*, *Nitrosospira multiformis* では 3, *Nitrosococcus oceani* では 1, とされている (Norton et al., 2002)。よって、*amoA* コピー数の変動と AOB 細胞数の変動は一致しない場合がある。見かけ上 *amoA* コピー数が変動していないように見えても、AOB 群集の種構成に変化が起こっていれば、アンモニア酸化活性に影響を及ぼすことは十分ありうると考えられる。この考えに基づき、5.1.2, 5.1.3 において AOB の種構成変化を追った。

Fig. 5-3 と Fig. 5-4 から、本リアクターにおいて AOB の種構成に大きな変動があったことが示された。亜硝酸型硝化反応を示した活性汚泥では、完全硝化反応を示した活性汚泥からは検出できなかった OTU 2 (Fig. 5-3) であらわされた *amoA* 配列が 40 クローン中 12 クローンという高頻度で検出された。また、PCR-TRPLP の結果 (Fig. 5-4) から、リアクター内に OTU 2 であらわされる *amoA* が出現し始めたのは、リアクターのアンモニア酸化活性が回復を始め、亜硝酸型硝化反応を示し始めた 174-181 日目頃であったことが示された。このことは、本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応に AOB の種構成変化が何らかの形で関わった可能性を強く支持する結果であると考えられる。

BLAST による相同性検索から、OTU 1 は *Nitrosococcus mobilis* Nc2 や *Nitrosomonas* sp. Nm104 などに近縁であり、OTU 2 は *Nitrosomonas eutropha* に近縁であった。これらの株は、*Nitrosomonas europaea*/*Nitrosococcus mobilis* Lineage と表現されるグループ (Purkhold et al. 2000, Koops et al 2003) における代表的な株であり、塩耐性あるいは好塩性を示すことで知られているが、*amo* オペロン数に関して詳細に記述した報告はないため、これらの結果と 5.3.1 の *amoA* コピー数変動の結果についての深い考察には至ることができなかった。

## 5.4 まとめ

---

本章では、第4章で構築したリアクターにおける硝化細菌群集解析を行った。

AOB, NOB に対して、その存在量の変動を追跡するために行った QPrimer-PCR の結果から、完全硝化反応時と亜硝酸型硝化反応時において NOB の存在量が  $10^2$  程度減少したことが示唆された。

AOB の存在量は運転期間を通じて大きな変動はなかったが、PCR-Cloning-Sequencing と PCR-TRFLP によって AOB 種構成の変化を捉えることができた。完全硝化反応が観察された時期では *N. mobilis* に近縁な種の存在が示唆され、亜硝酸型硝化反応が観察され始めた運転 181 日目ごろから *N. mobilis* 近縁種のほかに *N. eutropha* 近縁種が出現したことが示唆された。

本章および第4章で得られた実験結果を元に、QPrimer-PCR によって得られた *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数の変動に注目した運転期間中各時期における単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性を算出した。その結果、本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応は単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性が失活したことをきっかけに起こったこと、その後の亜硝酸型硝化反応の安定的な維持は、単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性の低下によるものではなく、*Nitrobacter* の細胞数 (QPrimer-PCR によって検出された 16S rDNA コピー数) の減少によって説明され得るものであった。

PCR-Cloning-Sequencing により得られた AOB・NOB 由来 DNA の塩基配列情報から、本リアクターに存在した AOB・NOB の種構成は極めて単純であったことが示された。本リアクター内において存在が確認された硝化細菌は、AOB, NOB とともに高塩環境に適応した種であった。

以上、第4章で構築されたリアクターにおける硝化細菌群集解析により、AOB, NOB とともにその興味深い挙動が観察された。だが一方で、第4章におけるリアクター水質モニタリングでとらえた、亜硝酸型硝化反応実現直前のアンモニア酸化活性の失活を明確に説明できるような実験データは得られなかった。



## 第6章 総括

### 6.1 研究成果

---

第1章において本研究が掲げた目的を顧みたい。本研究では、以下の3点を目的として掲げた。

- 1) 実験室規模活性汚泥リアクターにおいて亜硝酸型硝化反応を得る。
  - 2) 1)のリアクターにおける硝化細菌群集の挙動を解析し、亜硝酸型硝化反応と硝化細菌群集の関係性を見出す。
  - 3) 1), 2)を踏まえ、亜硝酸型硝化反応の安定的な維持にかかわる要素を記述する。
- これを踏まえ、以降、本研究の成果についてまとめた。

本研究では、亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification) と呼ばれる、新奇生物学的窒素除去法の確立への多大な貢献が期待される微生物反応を取り上げた。亜硝酸型硝化反応は、多くの研究者による取り組みにも関わらず、未だその安定的制御法が確立されていない。これは、亜硝酸型硝化反応がアンモニア酸化細菌 (AOB) と亜硝酸酸化細菌 (NOB) の間のわずかな生育速度の差、至的環境要因の差を縫うようにして起こる現象であるとともに、亜硝酸型硝化反応の鍵を握る亜硝酸酸化細菌の解析手法が発展途上であることにも一因があるだろう。

そのような状況の中、本研究では実験室規模で亜硝酸型硝化反応を行う活性汚泥リアクターの構築を目指し、詳細なリアクター内の水質モニタリング、硝化細菌群集解析を行うことによって、亜硝酸型硝化反応の発現に必要な因子の探索、亜硝酸型硝化反応を長期間安定的に維持するための条件の解明を目標とした。

本研究における実験結果は論文中第4章と第5章にまとめた。第4章では、実験室規模の亜硝酸型硝化リアクターの構築過程について記述した。リアクター運転開始当初、期待していた亜硝酸型硝化反応が得られなかったが、2度の運転条件の変更の末に、亜硝酸型硝化反応を獲得することができた。亜硝酸型硝化反応は、最初の運転条件変更 (硝化工程前段への脱窒工程の導入) からおよそ2ヶ月後、2度目の運転条件変更 (pH 制御値の上方修正) からおよそ1ヶ月後の運転150日目頃から観察されたアンモニア酸化活性のダイナミックな変動の後に、獲得された。これによって、掲げた目的1) が達成されたといえる。

だが、2度の運転条件変更からアンモニア酸化活性の変動、あるいは亜硝酸型硝化反応の獲得までの数ヶ月もの時間差を説明することは困難であり、何がきっかけで一連の現象が起こったのかは明確にはできなかった。また、研究開始当初注目していたチオ硫酸の亜硝酸型硝化反応への寄与を評価するには至らなかった。第4章における実験結果からは、一

つひとつの運転条件と亜硝酸型硝化反応との関連性を見出すことは困難であったが、本章における一連の実験結果は、亜硝酸型硝化反応が単一ではない複数（pH，温度，嫌気好気条件，etc.）の条件が揃ったときに起こる現象であることを示唆した結果であったともいえる。

第5章では第4章において構築されたリアクターにおける硝化細菌の挙動解析実験結果について述べた。硝化反応の主役である AOB，NOB の定量的・定性的解析を行い，リアクターで観察された各硝化反応パターン（完全硝化 or 亜硝酸型硝化）に対する硝化細菌群の興味深い現象を記述できた。まず，AOB，NOB の存在量の変動を追跡した結果，完全硝化反応時と亜硝酸型硝化反応時において NOB の存在量が  $10^2$  程度減少したことが示唆された。また，AOB の存在量は運転期間を通じて顕著な変動はなかったが，AOB 種構成の変化を捉えることができた。完全硝化反応が観察された時期では *N. mobilis* に近縁な種の存在が示唆され，亜硝酸型硝化反応が観察され始めた運転 181 日目ごろから *N. mobilis* 近縁種のほかに *N. eutropha* 近縁種が出現したことが示唆された。

第5章および第4章で得られた実験結果を元に，運転期間中各時期における単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性を算出した結果，本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応は単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性が失活したことをきっかけに起こったこと，その後の亜硝酸型硝化反応の安定的な維持は，単位 *Nitrobacter* あたりの亜硝酸酸化活性の低下によるものではなく，*Nitrobacter* の細胞数の減少によるものであったことが示唆された。これらの結果をもって，目的2）がある程度達成された。

しかし，上述のように，本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応には解明しきれない部分も多く，最大の目的であった目的3）の達成には，残念ながら至らなかった。

とはいえ，本研究における成果の特徴である，詳細な水質モニタリングと硝化細菌群集解析による，リアクターのパフォーマンス（完全硝化反応 or 亜硝酸型硝化反応）と硝化細菌の挙動の関係の丁寧な記述があたえた知見は大変意義深いものであったと自負する。特に，定量的 PCR 法によって得られた NOB 存在量の情報と水質モニタリング結果から判断された単位 *Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化活性から，本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応の実態に迫ることができたのではないだろうか。また完全硝化型から亜硝酸型への硝化反応の遷移過程において捉えた AOB の種構成変化は，AOB と NOB の相互関係を考える上で大変興味深い現象であったといえるだろう。

## 6.2 課題と展望

---

6.1 で述べたように、本研究では実験室規模で亜硝酸型硝化リアクターを構築することができた。また、リアクターにおいて完全硝化型から亜硝酸型への硝化反応の遷移過程における硝化細菌群集の挙動を追跡することで、いくつかの興味深い示唆が得られた。

しかし一方で、第4章、第5章において記述したように、本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応の直前に観察された、アンモニア酸化活性の失活が何によってもたらされたのか、直後の亜硝酸型硝化反応へ寄与した現象であったのか、といった点に関して明確に論じられるデータを得ることはできなかった。さらにいうならば、亜硝酸型硝化反応を得るまでにリアクターに対して行った操作、硝化工程の前段への脱窒工程の導入、pH 制御値の上方修正が、亜硝酸型硝化反応にどれほど寄与したのかも不明確なままである。また、本研究におけるリアクターの運転・管理条件の参考とした新日本製鐵（株）ミニプラントで示唆された、流入排水中のチオ硫酸による亜硝酸型硝化反応を本研究で再現するには至らなかった。しかしこれらの疑問や課題は、言い換えれば亜硝酸型硝化反応の達成には複数のパラメータが関与していることを強く示唆するものであり、これらのパラメータをどう紐解いていくかが亜硝酸型硝化反応の制御に向けた重要な課題である。

硝化細菌群集解析に関していえば、本研究で行った解析では AOB、NOB の相互関係を見出すことは困難である。硝化反応が完全硝化型( $\text{NH}_4^+\text{-N}$  →  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )になるか亜硝酸型( $\text{NH}_4^+\text{-N}$  →  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )になるかは、AOB と NOB の単純な存在量だけでなく相互の関係性（空間的分布、酸素の競合など）が影響する可能性がある。本研究で捉えた、AOB 種構成変化、完全硝化反応時においても亜硝酸型硝化反応時においても変わらない亜硝酸酸化活性、を考えると、AOB と NOB の相互関係の把握が求められるであろう。

本研究で為しえなかったこれらの課題が克服されることを願うとともに、亜硝酸型硝化反応の制御方法が確立し、実排水処理に広く普及する日が近い将来訪れることを期待する。

## 謝辞

修士課程における成果を本論文にまとめるにあたりお世話になった方々にお礼申し上げたいと思います。

指導教官として惜しみないご指導を賜りました、味埜 俊 教授、並びに佐藤弘泰 助教授、小貫元治 助手（現 IR3S 特任講師）に心からの感謝の意を表します。味埜先生は研究に関することにとどまらず、卒業後の進路などについての相談にも親身に応じてくださいました。佐藤先生には、特に私の実験が波に乗らなかった時期に多くのアイデアを提案していただき、滅入りがちな気持ちを後押ししていただきました。また、小貫先生は、本研究の第一歩であったリアクターの立ち上げから、最後の実験を終えるまで、実験に関わる実際的な相談事に細やかに対応してくださいました。味埜・佐藤研究室の、学生の自主性を重んじる気風の中で、三先生の多大なるご支援に助けられ、のびのびと研究に励むことができました。

また、副指導教員を快く引き受けてくださった、工学系研究科附属水環境制御研究センター 栗栖 太 講師に深謝いたします。栗栖先生の的確なご指摘、ご助言は、私に多くのヒントを与えてくださいました。

本研究で立ち上げたリアクターの種汚泥は新日本製鐵株式会社先端技術研究所における安水処理試験プラントから分与いただき、運転管理条件も、同研究所におけるそれを参考にさせていただきました。同研究所の三木 理 博士、伊藤 公夫 博士には、惜しみない情報の提供を賜りました。また、同研究所の見学もさせていただくなど、非常に貴重な体験をさせていただきました。心からお礼申し上げます。

本研究における実験は、工学系研究科都市工学専攻の実験室（工学部 14 号館）および工学系研究科付属水環境制御研究センターの実験室（工学部 9 号館）において行いました。14 号館では、技官の唐沢祥嗣さん・中川博之さんに様々な面倒を見ていただきました。14 号館の実験室では、リアクターの流入水タンクから漏水を起こしてしまうなど多くの失敗をしてしまいましたが、お二人のサポートのおかげでなんとか実験を終えることができました。ありがとうございました。9 号館では、工学系研究科都市工学専攻博士 2 年 岩井祥子さんをはじめ、多くの方にお世話になりました。分子生物学的手法を用いた実験の経験が全くなかった私が滞りなく実験を進めることができたのも、皆さんのおかげであったと思っています。

味埜・佐藤研究室のメンバーの方々には、研究の相談はもちろんのこと、修士課程における様々な局面で多くの助けを頂きました。当専攻博士課程 2 年の小田和賢さん、末岡一男さん、福島寿和さんからはここには書ききれないほどの本当に多くのことをご教示いただきました。一年先輩の荒生 遵さん（現・凸版印刷株式会社）からはリアクター実験に関する基礎的な知識を授かりました。また、荒生さんは気落ちしがちな私をいつも励ましてくださいました。同期の宇田直樹君、押木守君は、他分野から当専攻に進学した私にとって、最も身近な目標でした。また、右も左も分からない私をことあるごとに助けてくれました。修了後はそれぞれの道を歩みますが、今後もよい関係を築いていきたいと思っています。“窒素グループ”の金井佑樹君とは居室での席が背中合わせであり、日ごろから研究に関する有益な議論を交わしてもらいました。また金井君には本研究で構築したリアクターを引き継いでもらいました。研究内容が大きく異なることもあり、研究に関する議論はほとんどできなかったものの、玉井暁大君、護山元気君にもお世話になりました。また、後輩の皆さんにも多くのことを教えていただきました。

最後になりましたが、大学院への進学に理解を示し、学生生活を全面的に支え続けてくれた両親に感謝いたします。

2006 年 1 月 31 日

田中 秀治

## 引用文献

- Aakra, A., Utaaker, J. B. and Nes, I. F., 2001, Comparative phylogeny of the ammonia mono-oxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia -oxidizing bacteria FEMS Microbiology Letters, **205**: 237-242.
- Amann, R.I., David, L.K., and Stahl, A., 1990, Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. Journal of Bacteriology, **171**:762-770.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., 1995, Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, Microbial Reviews. **59**:143-169.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., and Srinath, E., G., 1976, Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, Journal WPCF, **48**(5): 835-852.
- Bae, W., Baek, S., Chung, J., Lee, Y., 2002, Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors, Biodegradation, **12**: 359-366.
- Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Sánchez, M., Méndez, R., Lema, J. M., 2002, Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit, Water Research, **36**: 2555-2560.
- Catalan-Sakairi, M. A. B, Wang, P. I. C., Matsumura, M., 1997, Journal of Fermentation and Bioengineering, **84**(6): 563-571.
- Chen, G. H., Wong, M. T., Okabe, S. and Watanabe, Y., 2003, Dynamic response of nitrifying activated sludge batch culture to increase chloride concentration, Water Research, **37**: 3125-3135.
- Chen, G. H. and Wong, M. T., 2004, Impact of increased chloride concentration on nitrifying-activated sludge cultures, Journal of Environmental Engineering, **130**(2): 116-125.

- Daims, H., Nielsen, P. H., Juretschko, S. and Wargner, M., 2000, Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and *in situ* physiology, *Water Science and Technology*, 41(4-5): 85-90.
- Dahl, C., Sund, C., Kristensen, G. H., and Vredendregt, L., 1997, Combined biological nitrification and denitrification of high-salinity wastewater, *Water Science and Technology*, **36**(2-3): 345-352.
- Dangcong, P., Bernet, N., Delgenes, J. P., and Moletta, R., 2000, Effect of oxygen supply methods on the performance of a sequencing batch reactor for high ammonium nitrification, *Water Environment Research*, 72(2): 195-200.
- Degrange, V., and Bardin, R., 1995, Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 5273-5284.
- Dinçer, A. R., and Kargi, F., 1999, Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater, *Environmental Technology*, **20**: 1147-11553.
- Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G. , Gregory, I. R., Robinson, K. G., and Sayler, G. S., 2002, Quantification of *Nitrosomonas oligotropha* like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 245-253.
- Glass, C., and Silverstein, J., 1998, Denitrification kinetics of high nitrite concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation, *Water Research*, **32**(3): 831-839.
- Goos, R. J., 1985, Identification of ammonium thiosulfate as a nitrification and urease inhibitor, *Soil Science Society of America Journal*, **49**: 232-235.
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., and Field, K. G., 1990, Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton, *Nature*, **345**: 60-63.
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., and Saunders, J. R., 1993, The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences, *Journal of General Microbiology*, **139**: 1147-1153.

Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S., 1990a, Effect of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor, *Water Research*, **24**(3): 289-296.

Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S., 1990b, Nitrification at low DO levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor, *Water Research*, **24**(3): 297-302.

Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loodsdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J., 1998, The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater, *Water Science and Technology*, **37**(9): 135-142.

Hutton, W. C., and LaRocca, S. A., 1975, Biological treatment of concentrated high ammonia wastewaters, *Journal Water Pollution Control Federation*, **47**(5): 989-997, 1975

Janzen, H. H., and Bettany, J. R., 1986, Influence of thiosulfate on nitrification of ammonium in soil, *Soil Science Society of America Journal*, **50**: 803-806.

Jianlong, W., and Ning, Y., 2004, Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions, *Process Biochemistry*, **39**: 1223-1229.

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommerening-Roser, A., Koops, H. P., and Wagner, M., 1998, Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations, *Applied Environmental Microbiology*, **64**: 3042-3051.

Juretschko, S., 2000, Mikrobielle Populationsstruktur und -dynamik in einer nitrifizierenden/denitrifizierenden Belebtschlammanlage, Doctoral thesis (Technische Universität München).

Klotz, M. G., and Norton, J. M., 1995, Sequence of an ammonia monooxygenase subunit A-encoding gene from *Nitrospira* sp. NpAV, *Gene*, **163**: 159-160.

Koops, H. P., Harms, H., and Wehrmann, H., 1976, Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp., *Archives of Microbiology*, **10**: 277-282.

Koops H.-P., Purkhold U., Pommerening-Röser A., Timmermann G., and Wagner M., 2003, The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria, In M. Dworkin et al., eds., *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* third edition, release 3.13, March.

Koops, H.P., Böttcher, B., Möller, U. C., Pommering-Röser, A., and Stehr, G., 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov., and *Nitrosomonas halophila* sp. nov., *Journal of General Microbiology*, **137**: 1689-1699.

Kuai, L., and Verstraete, W., 1998, Ammonium removal by the oxygen limited autotrophic nitrification and denitrification (OLAND) system, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(11): 4500-4506.

Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaru, T., Kamagata, Y., and Kurane, R., 2001, Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA BODIPY® FL-labeled probe or primer, *Nucleic Acids Research*, **29**: e34.

Mauret, M., Paul, E., Puech-Costes, E., Mauret, M. T., and Baptiste, P., 1996, Application of experimental research methodology to the study of nitrification in mixed culture, *Water Science and Technology*, **34**(1): 245-252.

McTavish, H., Fuchs, J. A., and Hooper, A. B., 1993, Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*, *Journal of Bacteriology*, **175**: 2436-2444.

Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., and Herndl, G. J., 1999, Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(8): 3518-3525.

Mota, C., Head M. A., Ridenoure, J.A., Cheng, J. J., and de los Reyes, F., 2005, Effect of aeration cycle on nitrifying bacteria populations and nitrogen removal in intermittently aerated reactors, *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(12): 8565-8572.

Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., Hellinga, C. and van Kempen, R., 2001, Full-scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water Science and Technology*, **43**:127-134.

Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Suwa, Y., Klotz, M. G., 2002, Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria, *Archives of Microbiology*, **177**: 139-149.



- Orso, S., M. Gouy, E. Navarro, and P. Normand, 1994, Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp, *Integrated Journal of Systematic Bacteriology*, **44**:83–86
- Pommerening-Röser, A., G. Rath, and H.-P. Koops, 1996, Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*, *Systematic and Applied Microbiology*, **19**:344–351.
- Prosser, J. I., 1989, Autotrophic nitrification in bacteria, *Advanced in Microbial Physiology*, **30**: 125-181.
- Purkhold, U., Pommering-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P. and Wagner, M., 2000, Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 5368-5382.
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A. and Koops, H. P., 2003, 16S rRNA and *amoA*-based Phylogeny of 12 Novel Betaproteobacterial Ammonia Oxidizing Isolates: Extension of the Data Set and Proposal of a New Lineage within the Nitrosomonads, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 1485-1494.
- Rittmann, B. E. and McCarty, P. L., 2001, *Environmental biotechnology: principles and applications*, McGraw-Hill, New York.
- Rols, J. E., Mauret, M., Rahmani, H., Ngyen, K. M., Capdeville, B., Cornier, J. C., and, Deguin, A., 1994, Population dynamics and nitrite build-up in activated sludge and biofilm processes for nitrogen removal, *Water Science and Technology*, **29**(7): 43-51.
- Rothauwe, J. H., Witzel, K. P., and Liesack, W., 1997, The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4704-4712.
- Ruiz, G., Jeison, D., Chamy, R., 2003, Nitrification with high-nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration, *Water Research*, **37**: 1371-1377.
- Saad, O. A. L. O., Lehmann, S., Conrad, R., 1996, Influence of thiosulfate on nitrification, denitrification, and production of nitric oxide and nitrous oxide in soil, *Biology and Fertility of Soils*, **21**: 152-159.

- Sallade, Y. E., and Sims, J. T., 1992, Evaluation of thiosulfate as a nitrification inhibitor for manures and fertilizers, *Plant and Soil*, **147**: 283-291.
- Sánchez, O., Marti, M. C., Aspe, E., and Roeckel, M., 2001, Nitrification rates in a saline medium at different dissolved oxygen concentrations, *Biotechnology Letters*, **23**(19): 1597 - 1602
- Sánchez , O., Aspe, E., Marti, M. C., Roeckel, M., 2004, The effect of sodium chloride on the two-step kinetics of the nitrifying process, *Water Environment Reserch*, **76**(1): 73-80.
- Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. and Strous, M, 2003, New concept of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater, *FEMS Microbiology Reviews*, **27**:481-492.
- Schreiber, D. C., and Pavlostathis, S. G, 1998, Biological oxidation of thiosulfate in mixed heterotrophic/ autotrophic cultures, *Water Research*, **32**(5): 1363-1372.
- Smith, R. V., Doyle, R. M., Burns, L. C., and Stevens, R. J., 1997b, A model for nitrite accumulation in soils, *Soil Biology and Biochemistry*, **29** (8): 1241-1247.
- Sorokin, D. Y., G. Muyzer, T. Brinkhoff, J. G. Kuenen, and M. S. Jetten, 1998, Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus* sp. nov., *Archives.of Microbiology*, **170**:345–352.
- Stenatrm, M. K., and Poduska, R. A., 1980, The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification, *Water Research*, **14**:643-649.
- Surmacz-Gorska , J., Cichon, A., and Miksch, K., 1997, Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification, *Water Science and Technology*, **36**(10): 73-78.
- Suthersan, S., and Ganczarczyk, J. J., 1986, Inhibition of nitrite oxidation during nitrification, some observations, *Water Pollution Research Journal of Canada*, **21**(2): 257-266.

- Suwa, Y., T. Sumino, and K. Noto. 1997. Phylogenetic relationships of activated sludge isolates of ammonia oxidizers with different sensitivities to ammonium sulfate. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**:373–379.
- Suzuki, I., 1999, Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions, *Canadian Journal of Microbiology*, **45**: 97-105.
- Teske, A., E. Alm, J. M. Regan, T. S., B. E. Rittmann, and D. A. Stahl, 1994, Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria, *Journal of Bacteriology*, **176**: 6623–6630.
- Turk, O., and Mavinic, D. S., 1989, Stability of nitrite build-up in an activated sludge system, *Journal of WPCF*, **61**(8): 1440-1448.
- Van Loosdrecht M.C.M., Jetten, M.S.M., 1998, Microbiological conversions in nitrogen removal, *Water Science and Technology*, **38**(1), 1-7.
- Venterea, R. T., and Rolston, D. E., 2000, Mechanisms of and kinetics of nitric and nitrous oxide production during nitrification in agricultural soil, *Global Changes in Biology*(??), **6**(3): 303-316.
- Villaverde, S., Fdz-Polanco, F., and Garcia, P. A., 2000, Nitrifying biofilm acclimation to free ammonia in submerged bifilters, *Water Research*, **31**(2): 602-610.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H. P., Flood, J., and Amann, R., 1996, In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants, *Water Science and Technology*, **34**(1-2): 237-244.
- Wiesmann, U., 1994, Biological nitrogen removal from wastewater, *Advanced Biochemical Engineering*, **51**:113-154.
- Yang, L., and Alleman, J. E., 1992, Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture, *Water Science and Technology*, **26**(5-6): 997-1005.
- Ye, R. W., and Thomas, S. M., 2001, Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications, *Current Opinion in Microbiology*, **4**:307-312.

赤司昭, 2004, 亜硝酸酸化還元酵素遺伝子 (*norB*) の PCR による検出, 第 38 回日本水環境学会年会講演集: 381 .

北尾高嶺, 2003, 生物学的排水処理工学, pp.160-163, コロナ社, 東京 .

新田見匡, 2003, 亜硝酸還元酵素遺伝子に着目した脱窒細菌解析手法の確立及びその活性汚泥微生物群集解析への適用, 東京大学大学院新領域創成科学研究科博士論文.

高崎由紀, 2004, 亜硝酸蓄積型硝化脱窒処理プロセスにおける硝化細菌の挙動解析, 新領域創成科学研究科修士論文.

## 付録

論文中の考察で用いなかったものも含めて，第4章で構築したリアクターの水質モニタリングの数値データを掲載した。また，第5章で行った $\beta$ -AOB，*Nitrobacter* を対象としたPCR-Cloning-Sequencing によって得られた，Clone の塩基配列情報を記載した。

### 付録 1: リアクター水質モニタリング全データ

#### 5 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 硝化 | 0                  | 28    | 8.3 | 6.9 |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 15                 |       | 7.4 |     | 54.8  | 134  | 84.5                            | 10.5                            | 62.4                            | 7.38   | 49.9                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 | 29    | 7.2 | 4.6 | 33.3  | 132  | 27.7                            | 24.5                            | 76.8                            | -  | 54.2                             |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 29    | 7.3 | 5.9 | 13.4  | 136  | 4.33                            | 25.6                            | 105                             | -  | 54.8                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 7.5 | 6.6 | 10.5  | 142  | 3.76                            | 6.77                            | 131                             | -  | 56.6                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 29    | 7.6 | 7.1 | 3.55  | 138  | 5.26                            | 1.47                            | 136                             | -  | 56.3                             |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 7.4 | 7.0 | 3.14  | 140  | 0.00                            | 1.75                            | 141                             | -  | 59.9                             |

#### 8 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 硝化 | 0                  | 30    | 8.4 | 4.8 | 69    | 126  | 64                              | 4.7                             | 59.7                            | 18.4   | 40.2                             |
|    | 15                 |       | 7.2 |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 30                 | 29    | 7.2 | 3.6 | 56    | 122  | 53.1                            | 17.1                            | 65.7                            | -  | 52.0                             |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 | 29    | 7.3 | 4.3 | 32    | 120  | 23.6                            | 26.7                            | 77.1                            | -  | 52.3                             |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 7.3 | 6.3 | 11    | 119  | 0.89                            | 23.7                            | 108                             | -  | 53.3                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 7.6 | 7   | 2.1   | 121  | 2.89                            | 5.79                            | 131                             | -  | 54.6                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 7.5 | 5.2 | 2.4   | 126  | 10.39                           | 0.39                            | 132                             | -  | 55.0                             |

## 11 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 硝化 | 0                  | 29    | 8.4 | 3.5 | 67    | 128  | 65                              | 3.2                             | 53.9                            | 16.6   | 42.0                             |
|    | 15                 |       | 7.2 |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 30                 | 28    | 7.2 | 3.6 | 48    | 125  | 48.0                            | 16.0                            | 59.4                            | 19.4   | 52.0                             |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 | 29    | 7.3 | 4.2 | 25    | 120  | 22.8                            | 25.6                            | 70.7                            | -  | 52.9                             |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 29    | 7.3 | 6.1 | 11    | 126  | 2.91                            | 21.9                            | 101                             | -  | 55.9                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 7.7 | 6.7 | 10.0  | 120  | 3.02                            | 2.43                            | 120                             | -  | 55.2                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 7.7 | 6.9 | 1.7   | 123  | -                               | -                               | 122                             | -  | 57.1                             |

## 19 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 硝化 | 0                  | 28    | 7.3 | 1.7 | 63    | 152  | 94                              | 3.0                             | 71.3                            | 16.1   | 37.9                             |
|    | 15                 |       | 7.4 |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 30                 | 28    | 7.3 | 3.1 | 31    | 150  | 65.0                            | 12.5                            | 80.2                            | -  | 49.3                             |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 | 29    | 7.2 | 3.2 | 29    | 144  | 60.0                            | 21.8                            | 97.1                            | -  | 49.6                             |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 29    | 7.5 | 5.9 | -     | 143  | 26.00                           | 19.1                            | 127                             | -  | 49.3                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 8.0 | 7.3 | -     | 141  | 9.30                            | 2.84                            | 145                             | -  | 50.4                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 8.0 | 7.3 | -     | 145  | 25.00                           | 2.88                            | 146                             | -  | 52.1                             |

## 26日

| 基質流入終了後 |     |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|---------|-----|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 工程      | min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
| 硝化      | 0   | 27    | 7.3 | 1.8 | 70    | 138  | 69                              | 0.7                             | 71.0                            | 32.0   | 48.7                             |
|         | 15  |       | 7.4 |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 30  | 28    | 7.2 | 2.5 | 33    | 138  | 58.3                            | 8.9                             | 79.7                            | -  | 68.7                             |
|         | 45  |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 60  | 29    | 7.3 |     | 39    | 140  | 25.5                            | 16.1                            | 98.1                            | -  | 69.9                             |
|         | 75  |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 90  |       |     | 6.1 |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 105 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 120 | 29    | 7.7 | 6.2 | 28    | 142  | -                               | 10.4                            | 132                             | -  | 69.0                             |
|         | 135 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 150 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 165 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 180 | 29    | 8.1 | 6.8 | 1.3   | 142  | 8.29                            | -                               | 147                             | -  | 72.5                             |
|         | 195 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 210 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 225 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 240 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 255 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 270 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 285 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 300 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 315 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 330 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 345 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 360 | 29    | 8.1 | 6.4 | 2.6   | 139  | -                               | -                               | 147                             | -  | 78.1                             |

## 29日

| 基質流入終了後 |     |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|---------|-----|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 工程      | min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
| 硝化      | 0   | 26    | 7.3 | 2.7 | 74    | 138  | 60.8                            | 3.39                            | 67.3                            | 20.5   | 67.4                             |
|         | 15  | 25    | 7.3 | 2.3 | 43    | 140  | 56.6                            | 6.18                            | 68.7                            | -  | 79.3                             |
|         | 30  | 26    | 7.3 | 6.0 | 39    | 141  | 52.9                            | 10.6                            | 69.5                            | -  | 76.8                             |
|         | 45  |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 60  | 28    | 7.3 | 3.8 | 41    | 134  | 36.0                            | 19.0                            | 82.1                            | -  | 77.9                             |
|         | 75  |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 90  |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 105 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 120 | 29    | 7.4 | 5.9 | 2.3   | 138  | 2.685                           | 20.8                            | 118                             | -  | 78.7                             |
|         | 135 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 150 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 165 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 180 | 29    | 8.0 | 6.7 | 1.5   | 133  | 4.930                           | 2.44                            | 141                             | -  | 83.3                             |
|         | 195 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 210 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 225 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 240 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 255 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 270 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 285 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 300 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 315 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 330 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 345 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|         | 360 | 29    | 8.1 | 7.1 | 1.9   | 139  | 10.4                            | 2.39                            | 144                             | -  | 92.5                             |

### 36 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
|    | 0                  | 25    | 7.4 | 1.8 | 78    | 130  | 111                             | 2.15                            | 55.4                            | 14.7   | 63.6                             |
|    | 15                 | 26    | 7.5 | 2.0 | 36    | 131  | 104                             | 6.73                            | 56.0                            | -  | 72.5                             |
|    | 30                 | 27    | 7.2 | 3.2 | 0     | 131  | 30.6                            | 12.2                            | 60.6                            | -  | 74.0                             |
|    | 45                 | 27    | 7.2 | 4.5 | 0.1   | 132  | 40.6                            |                                 | 67.2                            | -  | 75.1                             |
|    | 60                 | 28    | 7.2 | 2.6 | -     | 130  | 29.1                            | 21.5                            | 67.6                            | -  | 72.7                             |
|    | 75                 | 28    | 7.2 | 4.3 | -     | 128  | -                               | 26.3                            | 73.1                            | -  | 73.3                             |
|    | 90                 | 29    | 7.2 | 3.2 | 0.7   | 125  | -                               | 30.9                            | 77.9                            | -  | 72.9                             |
|    | 105                | 29    | 7.3 | 2.2 | 0.5   | 126  | 6.06                            | 35.5                            | 85.5                            | -  | 74.0                             |
|    | 120                | 29    | 7.3 | 4.1 | 1.9   | 125  | -                               | 31.3                            | 94.3                            | -  | 73.8                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 8.0 | 5.9 | -     | 130  | 0.7                             | 8.3                             | 120                             | -  | 76.7                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 180                | 29    | 8.1 | 6.8 | 0.0   | 128  | 55.57                           | 3.51                            | 123                             | -  | 78.2                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 8.1 | 7.3 | 0.0   | 130  | -                               | 4.32                            | 123                             | -  | 86.7                             |

### 44 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
|    | 0                  | 28    | 7.4 | 2.7 | 64.9  | 128  | 86                              | 1.36                            | 51.2                            | 14.2   | 70.5                             |
|    | 15                 | 28    | 7.3 | 2.6 | 39.2  | 128  | 70                              | 5.68                            | 54.9                            | -  | 80.2                             |
|    | 30                 | 28    | 7.2 | 3.7 | 46.9  | 125  | 52.3                            | 12.6                            | 59.5                            | -  | 80.6                             |
|    | 45                 | 28    | 3.7 | 2.1 | 41.5  | 124  | 34.6                            | 19.6                            | 62.8                            | -  | 79.6                             |
|    | 60                 | 28    | 7.2 | 2.0 | 40.6  | 121  | 33.5                            | 28.0                            | 66.7                            | -  | 78.1                             |
|    | 75                 | 28    | 7.2 | 2.5 | 32.0  | 123  | 36.1                            | 32.2                            | 72.9                            | -  | 78.1                             |
|    | 90                 | 28    | 7.3 | 3.4 | -     | 120  | -                               | 34.1                            | 81.2                            | -  | 78.5                             |
|    | 105                | 28    | 8.0 | 5.3 | 1.81  | 120  | 2.09                            | 20.4                            | 97.6                            | -  | 79.4                             |
|    | 120                | 28    | 8.1 | 5.3 | 0.85  | 122  | 4.29                            | 10.1                            | 111.3                           | -  | 80.5                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 28    | 8.1 | 6.2 | 2.36  | 123  | 34.2                            | 0.2                             | 121                             | -  | 83.2                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 180                | 29    | 8.1 | 6.2 | 2.32  | 124  | -                               | -                               | 121                             | -  | 85.1                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 8.1 | 5.3 | 2.36  | 122  | 26.6                            | 0.04                            | 122                             | -  | 93.4                             |



## 50 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO   | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|------|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
|    | 0                  | 28    | 7.4 | N.A. | 71.5  | 127  | 70.7                            | 1.18                            | 47.6                            | 21.0   | 58.7                             |
|    | 15                 | 28    | 7.3 | N.A. | 38.0  | 125  | 67.9                            | 6.79                            | 50.3                            | -  | 70.1                             |
|    | 30                 | 28    | 7.2 | N.A. | 5.4   | 122  | 50.3                            | 12.4                            | 55.7                            | -  | 72.2                             |
|    | 45                 | 29    | 7.2 | N.A. | 0.6   | 124  | 39.8                            | 19.2                            | 56.6                            | -  | 68.9                             |
|    | 60                 | 29    | 7.3 | N.A. | 1.3   | 119  | 38.0                            | 26.3                            | 62.2                            | -  | 70.0                             |
|    | 75                 | 29    | 7.3 | N.A. | 0.0   | 119  | 19.3                            | 31.2                            | 67.4                            | -  | 69.6                             |
|    | 90                 | 29    | 7.3 | N.A. | 0.33  | 115  | 7.59                            | 34.7                            | 72.6                            | -  | 69.3                             |
|    | 105                | 29    | 7.5 | N.A. | 0.15  | 116  | 9.57                            | 31.4                            | 81.7                            | -  | 69.4                             |
|    | 120                | 29    | 8.0 | N.A. | 0.99  | 119  | 7.99                            | 22.1                            | 91.5                            | -  | 70.2                             |
|    | 135                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 8.0 | N.A. | 1.80  | 120  | 2.45                            | 5.20                            | 108                             | -  | 71.6                             |
|    | 165                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 180                | 29    | 8.0 | N.A. | 0.65  | 122  | -                               | 0.85                            | 114                             | -  | 74.4                             |
|    | 195                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |      |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 8.0 | N.A. | 1.66  | 123  | 3.44                            | 0.99                            | 113                             | -  | 81.6                             |

## 57 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
|    | 0                  | 27    | 7.4 | 2.7 | 74.3  | 133  | 86.7                            | 2.15                            | 64.7                            |  | 61.2                             |
|    | 15                 | 27    | 7.5 | 2.6 | 45.2  | 125  | 84.7                            | 3.60                            | 64.9                            |  | 79.7                             |
|    | 30                 | 28    | 7.2 | 3.7 | 42.6  | 122  | 71.0                            | 10.2                            | 70.3                            |  | 81.0                             |
|    | 45                 | 28    | 7.2 | 2.1 | 43.1  | 124  | 57.8                            | 15.8                            | 76.2                            |  | 81.7                             |
|    | 60                 | 29    | 7.2 | 2.0 | 10.7  | 125  | 54.4                            | 19.7                            | 77.0                            |  | 79.2                             |
|    | 75                 | 29    | 7.3 | 2.5 | 2.9   | 121  | 33.4                            | 24.3                            | 83.2                            |  | 79.7                             |
|    | 90                 | 29    | 7.3 | 3.4 | 6.24  | 117  | 27.9                            | 29.7                            | 88.7                            |  | 80.0                             |
|    | 105                | 29    | 7.2 | 5.3 | 17.79 | 117  | 15.8                            | 33.4                            | 96.0                            |  | 80.5                             |
|    | 120                | 29    | 7.3 | 5.3 | 18.12 | 120  | 15.0                            | 35.6                            | 102                             |  | 80.5                             |
|    | 135                | 29    |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 7.9 | 6.2 | 10.94 | 123  | 5.27                            | 22.2                            | 128                             |  | 80.3                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 180                | 29    | 8.0 | 6.2 | 10.49 | 128  | 3.67                            | 4.48                            | 151                             |  | 82.5                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 8.0 | 5.3 | 11.20 | 125  | 5.83                            | 0.60                            | 156                             |  | 93.3                             |

## 64日

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 硝化 | 0                  | 28    | 7.2 | 1.3 | 80.5  | 123  | 70.7                            | 6.02                            | 35.0                            | 39.5   | 51.6                             |
|    | 15                 | 27    | 7.6 | 1.2 | 49.7  | 117  | 67.9                            | 8.73                            | 31.4                            | 21.0   | 63.8                             |
|    | 30                 | 27    | 7.3 | 1.5 | 40.0  | 111  | 50.3                            | 11.2                            | 34.8                            | -  | 77.7                             |
|    | 45                 | 28    | 7.3 | 1.9 | 37.2  | 109  | 39.8                            | 13.7                            | 40.2                            | -  | 79.0                             |
|    | 60                 | 28    | 7.2 | 1.9 | 3.75  | 110  | 38.0                            | 15.7                            | 42.8                            | -  | 77.1                             |
|    | 75                 | 28    | 7.3 | 1.8 | 3.12  | 114  | 19.3                            | 17.1                            | 47.9                            | -  | 77.2                             |
|    | 90                 | 29    | 7.2 | 2.2 | 2.83  | 102  | 7.59                            | 18.4                            | 53.1                            | -  | 77.5                             |
|    | 105                | 29    | 7.3 | 2.3 | 2.27  | 105  | 9.57                            | 18.9                            | 59.4                            | -  | 79.3                             |
|    | 120                | 29    | 7.3 | 2.5 | 2.54  | 105  | 7.99                            |                                 | 64.4                            | -  | 78.9                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 7.3 | 3.0 | 2.64  | 105  | 2.45                            | 17.9                            | 76.1                            | -  | 79.7                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 7.3 | 3.9 | 2.93  | 112  | -                               | 14.4                            | 87.3                            | -  | 79.3                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 7.5 | 6.8 | 2.19  | 110  | 3.44                            | -                               | 109                             | -  | 87.4                             |

## 71日

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 硝化 | 0                  | 27    | 7.5 |     | 61.2  | 119  | 79.7                            | 3.09                            | 47.2                            | 27.0   | 70.9                             |
|    | 15                 | 27    | 7.3 |     | 46.8  | 111  | 77.1                            | 6.55                            | 45.8                            | -  | 89.0                             |
|    | 30                 | 28    | 7.2 |     | 34.3  | 109  | 62.7                            | 11.5                            | 50.4                            | -  | 90.0                             |
|    | 45                 | 28    | 7.2 |     | 2.8   | 103  | 48.1                            | 16.1                            | 53.9                            | -  | 89.6                             |
|    | 60                 | 29    | 7.3 | 1.4 | 1.39  | 99   | 45.7                            | 22.5                            | 55.3                            | -  | 86.6                             |
|    | 75                 | 29    | 7.2 | 1.0 | 1.81  | 102  | 31.5                            | 28.0                            | 58.7                            | -  | 86.8                             |
|    | 90                 | 29    | 7.3 | 1.2 | 0.90  | 105  | 18.61                           | 32.7                            | 62.3                            | -  | 87.6                             |
|    | 105                | 30    | 7.2 | 1.6 | 0.81  | 108  | 16.22                           | 38.3                            | 66.7                            | -  | 87.6                             |
|    | 120                | 30    | 7.3 | 2.0 | 1.02  | 114  | 17.11                           | 37.0                            | 77.2                            | -  | 88.5                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 8.1 | 6.1 | 1.57  | 118  | -                               | 2.4                             | 114.0                           | -  | 89.6                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 8.1 |     | 1.74  | 117  | 1.41                            | -                               | 117.9                           | -  | 91.6                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 8.2 | 8.6 | 1.81  | 119  | 1.43                            | -                               | 118                             | -  | 99.2                             |

## 76日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 25    | 7.2 | 0.6 | 181   | 84.6 | 76.4                            | 4.31                            | 10.5                            | 33.4   | 59.4                             |
|    | 15                 | 25    | 7.6 | 0.3 | 57.3  | 54.3 | 71.4                            | -                               | 1.61                            | 22.3   | 67.2                             |
|    | 30                 | 27    | 7.5 | 0.3 | 59.6  | 47.3 | 78.7                            | -                               | 1.64                            | 22.4   | 67.7                             |
|    | 45                 | 28    | 7.5 | 0.3 | 61.0  | 43.8 | 76.6                            | -                               | 1.57                            | 22.5   | 67.6                             |
|    | 60                 | 28    | 7.4 | 0.2 | 61.6  | 41.3 | 71.0                            | -                               | 1.54                            | 21.8   | 67.8                             |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 | 29    | 7.4 | 0.3 | 64.9  | 47.4 | 82.02                           | 0.72                            | 1.70                            | 22.4   | 68.4                             |
|    | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 120                | 29    | 7.6 | 0.9 | 62.2  | 44.9 | 63.99                           | -                               | 1.56                            | 21.3   | 69.2                             |
|    | 135                | 29    | 7.9 | 0.5 | 27.2  | 39.7 | 67.0                            | -                               | 1.53                            | 3.1  | 81.5                             |
|    | 150                | 29    | 8.1 | 1.0 | 0.82  | 40.5 | 71.48                           | -                               | 1.59                            | -  | 84.6                             |
|    | 165                | 29    | 7.6 | 1.1 | 0.71  | 41.0 | 54.7                            | 6.69                            | 1.71                            | -  | 86.0                             |
|    | 180                | 29    | 7.4 | 1.2 | 0.65  | 42.4 | 46.14                           | 12.8                            | 3.20                            | -  | 87.4                             |
|    | 195                | 29    | 7.4 | 1.4 | 0.99  | 43.9 | 37.0                            | 17.9                            | 5.56                            | -  | 85.8                             |
|    | 210                | 29    | 7.3 | 1.5 | 1.33  | 45.3 | 23.7                            | 23.6                            | 8.12                            | -  | 87.1                             |
|    | 225                | 29    | 7.3 | 1.4 | 0.78  | 45.0 | 19.1                            | 29.5                            | 10.1                            | -  | 87.7                             |
|    | 240                | 29    | 7.2 | 1.2 | 1.77  | 49.0 | 21.5                            | 34.4                            | 13.5                            | -  | 87.0                             |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 29    | 7.8 | 5.6 | 1.55  | 53.7 | 9.6                             | 17.7                            | 35.0                            | -  | 88.0                             |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 28    | 8.0 | 7.4 | 1.45  | 56.3 | 7.1                             | -                               | 53.1                            | -  | 89.8                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 28    | 8.1 | 7.8 | 1.38  | 56.2 | -                               | -                               | 54.0                            | -  | 93.6                             |

## 79日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN   | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|--------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 27    | 7.3 | 0.3 | 103   | 71.6   | 72.6                            | 3.78                            | 6.91                            | 34.5   | 62.0                             |
|    | 15                 | 27    | 7.5 | 0.1 | 63.6  | 49.7   | 72.3                            | -                               | 1.61                            | 28.1   | 64.7                             |
|    | 30                 | 27    | 7.4 | 0.1 | 65.7  | 54.8   | 68.7                            | -                               | -                               | 27.9   | 65.2                             |
|    | 45                 | 28    | 7.3 | 0.1 | 67.4  | 55.8   | 69.0                            | -                               | -                               | 28.1   | 65.1                             |
|    | 60                 | 29    | 7.3 | 0.1 | 66.2  | 55.9   | 68.3                            | -                               | 1.64                            | 27.8   | 64.8                             |
|    | 75                 |       |     |     |       |        |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 | 29    | 7.3 | 0.1 | 65.8  | 51.5   | 74.2                            | -                               | 1.63                            | 27.8   | 64.8                             |
|    | 105                |       |     |     |       |        |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 120                | 29    |     | 0.1 | 67.0  | 57.397 | 68.8                            | -                               | 1.63                            | 27.9   | 65.9                             |
|    | 135                | 29    | 8.0 | 0.1 | 30.0  | 50.3   | 65.6                            | -                               | 1.65                            | 15.5   | 74.0                             |
|    | 150                | 29    | 8.1 | 0.8 | 2.04  | 46.7   | 62.4                            | -                               | 1.64                            | 4.2  | 83.0                             |
|    | 165                | 29    | 7.6 | 1.0 | 2.53  | 44.9   | 58.8                            | 4.07                            | 1.66                            | -  | 87.1                             |
|    | 180                | 29    | 7.5 | 1.1 | 1.66  | 45.4   | 54.8                            | 8.74                            | 2.23                            | -  | 89.3                             |
|    | 195                | 28    | 7.4 | 0.9 | 1.33  | 44.2   | 44.2                            | 13.8                            | 3.64                            | -  | 85.7                             |
|    | 210                | 28    | 7.3 | 1.5 | 1.13  | 47.4   | 34.0                            | 20.0                            | 5.38                            | -  | 87.7                             |
|    | 225                | 28    | 7.3 | 1.5 | 1.46  | 49.1   | 26.9                            | 25.6                            | 6.77                            | -  | 88.8                             |
|    | 240                | 28    | 7.2 | 1.3 | 2.20  | 50.1   | 19.0                            | 31.4                            | 9.13                            | -  | 88.7                             |
|    | 255                |       |     |     |       |        |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 28    | 7.3 | 1.8 | 2.11  | 52.8   | 3.8                             | 41.5                            | 12.7                            | -  | 88.7                             |
|    | 285                |       |     |     |       |        |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 28    | 7.8 | 5.7 | 2.40  | 56.9   | 3.1                             | 21.2                            | 35.2                            | -  | 90.0                             |
|    | 315                |       |     |     |       |        |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |        |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |        |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 28    | 8.0 | 7.5 | 2.29  | 57.9   | -                               | -                               | 57                              | -  | 95.1                             |

## 82 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 27    | 7.6 | 0.2 | 214   | NA   | 70.4                            | -                               | -                               | 38.1   | 24.0                             |
|    | 15                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 30                 | 27    | 7.2 | 0.1 | 195   | NA   | 71.9                            | -                               | -                               | 37.2   | 24.2                             |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 | 29    | 7.3 | 0.1 | 108   | NA   | 66.2                            | -                               | -                               | 37.0   | 24.4                             |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 29    | 7.3 | 0.4 | 106   | NA   | 65.5                            | -                               | -                               | 36.7   | 24.9                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 8.2 | 1.3 | 35.8  | NA   | 57.4                            | -                               | -                               | 15.6   | 37.0                             |
|    | 165                | 29    | 8.3 | 1.2 | 8.06  | NA   | 57.0                            | -                               | -                               | 6.97   | 42.9                             |
|    | 180                | 29    | 8.2 | 1.4 | 0.77  | NA   | 50.7                            | 2.37                            | -                               | -  | 48.4                             |
|    | 195                | 29    | 7.8 | 1.7 | 0.69  | NA   | 48.4                            | 8.57                            | 3.1                             | -  | 47.6                             |
|    | 210                | 29    | 7.7 | 1.5 | 0.49  | NA   | 39.4                            | 13.1                            | 3.3                             | -  | 48.5                             |
|    | 225                | 29    | 7.7 | 1.4 | -     | NA   | 31.9                            | 18.5                            | 4.4                             | -  | 48.5                             |
|    | 240                | 29    | 7.7 | 1.4 | 0.77  | NA   | 30.6                            | 23.1                            | 6.4                             | -  | 49.0                             |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 29    | 7.6 | 1.7 | 0.42  | NA   | 13.9                            | 30.9                            | 11.6                            | -  | 50.4                             |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 29    | 7.8 | 5.1 | 0.14  | NA   | 0.5                             | 26.3                            | 23.4                            | -  | 50.7                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 28    | 8.4 | 8.1 | 0.72  | NA   | -                               | -                               | 48.8                            | -  | 53.8                             |

## 85 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 24    | 7.1 | 0.2 | 71.5  | NA   | 77.7                            | 10.74                           | 4.1                             | 35.0   | 54.9                             |
|    | 15                 | 25    | 7.9 | 0.1 | 45.7  | NA   | 73.0                            | -                               | -                               | 30.4   | 57.6                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 | 28    | 7.7 | 0.1 | 48.1  | NA   | 75.4                            | -                               | -                               | 29.7   | 58.2                             |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 29    | 7.5 | 0.2 | 52.6  | NA   | 69.2                            | -                               | -                               | 29.9   | 58.5                             |
|    | 135                | 29    | 8.1 | -   | 10.6  | NA   | 74.5                            | -                               | -                               | 16.2   | 68.3                             |
|    | 150                | 29    | 8.1 | 1.1 | 3.18  | NA   | 66.2                            | -                               | -                               | -  | 80.1                             |
|    | 165                | 29    | 7.6 | 1.3 | 3.42  | NA   | 64.8                            | 4.43                            | -                               | -  | 83.1                             |
|    | 180                | 29    | 7.5 | 0.9 | 2.61  | NA   | 50.0                            | 9.25                            | 2.5                             | -  | 77.7                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                | 29    | 7.3 | 1.7 | 3.60  | NA   | 45.3                            | 23.0                            | 5.8                             | -  | 79.1                             |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                | 29    | 7.3 | 1.4 | 3.60  | NA   | 24.5                            | 35.3                            | 8.4                             | -  | 78.8                             |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 29    | 7.3 | 2.6 | 3.69  | NA   | 12.0                            | 41.8                            | 15.3                            | -  | 79.9                             |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 29    | 7.6 | 6.2 | 4.90  | NA   | 4.55                            | 22.4                            | 32.8                            | -  | 80.8                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                | 29    | 8.0 | 7.0 | 2.51  | NA   | 2.3                             | 4.40                            | 50.2                            | -  | 81.3                             |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 29    | 8.0 | 7.5 | 2.74  | NA   | 8.45                            | -                               | 55.8                            | -  | 87.3                             |

## 92 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC   | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|---------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 26    | 7.3 | 0.2 | 134.4   | 102  | 76.8                            | 12.70                           | 12.1                            | 36.2   | 56.9                             |
|    | 15                 | 27    | 8.4 | 0.3 | 122.3   | 96.2 | 96.2                            | -                               | -                               | 30.4   | 60.2                             |
|    | 30                 |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 120                | 29    | 8   | 0.1 | 134.427 | 98.0 | 98.0                            | -                               | -                               | 30.2   | 62.3                             |
|    | 135                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 7.8 | 1.2 | 113.39  | 88.6 | 86.7                            | 1.92                            | -                               | -  | 86.9                             |
|    | 165                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 7.5 | 1.1 | 86.36   | 76.4 | 61.3                            | 12.5                            | 2.6                             | -  | 86.0                             |
|    | 195                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 29    | 7.3 | 1.4 | 2.93    | 96.0 | 41.2                            | 39.3                            | 15.5                            | -  | 87.8                             |
|    | 285                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 29    | 7.3 | 1.5 | 1.47    | 94.5 | 27.50                           | 46.5                            | 20.5                            | -  | 87.8                             |
|    | 315                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                | 29    | 7.2 | 1.5 | 1.44    | 96.4 | 14.8                            | 54.1                            | 27.5                            | -  | 89.5                             |
|    | 345                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |         |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 29    | 7.9 | 5.8 | 2.12    | 103  | 7.76                            | 6.02                            | 88.8                            | -  | 91.1                             |

## 104 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 26    | 7.6 |    | 129   | 131  | 118                             | 12.9                            | -                               | 36.1   | 56.7                             |
|    | 15                 | 27    | 8.3 |    | 117   | 99   | 98.8                            | 0.04                            | -                               | 33.2   | 58.8                             |
|    | 30                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 120                | 29    | 7.9 |    | 128   | 106  | 106                             | 0.0                             | -                               | 33.3   | 60.0                             |
|    | 135                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 7.7 |    | 110   | 108  | 106                             | 1.51                            | -                               | -  | 87.7                             |
|    | 165                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 7.5 |    | 88.0  | 111  | 98.0                            | 9.51                            | 3.9                             | -  | 85.9                             |
|    | 195                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 29    | 7.3 |    | 45.0  | 106  | 59.9                            | 15.9                            | 29.7                            | -  | 88.0                             |
|    | 285                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 29    | 7.2 |    | 43.6  | 93   | 37.1                            | 14.2                            | 42.2                            | -  | 89.5                             |
|    | 315                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                | 29    | 7.2 |    | 2.88  | 95   | 27.2                            | 12.2                            | 56.0                            | -  | 90.4                             |
|    | 345                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 29    | 7.6 |    | 2.76  | 106  | 11.90                           | -                               | 93.8                            | -  | 93.4                             |

## 114 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 24    | 8.0 |    | 249   | 151  | 132                             | 15.8                            | 4.40                            | 43.5   | 55.1                             |
|    | 15                 | 25    | 8.3 |    | 247   | 120  | 125                             | -                               | -                               | 40.9   | 56.5                             |
|    | 30                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 90                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 29    | 8.1 |    | 268   | 117  | 123                             | -                               | -                               | 40.6   | 57.3                             |
|    | 135                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 8.2 |    | 230   | 114  | 119                             | -                               | -                               | 15.4   | 77.6                             |
|    | 165                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 8.1 |    | 222   | 111  | 107                             | 5.09                            | 2.65                            | -  | 94.6                             |
|    | 195                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 29    | 8.2 |    | 220   | 111  | 64.3                            | 19.6                            | 18.0                            | -  | 90.4                             |
|    | 285                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 29    | 8.1 |    | 178   | 111  | 52.7                            | 21.6                            | 26.0                            | -  | 91.3                             |
|    | 315                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                | 29    | 8.1 |    | 2.60  | 109  | 44.6                            | 22.8                            | 35.5                            | -  | 93.1                             |
|    | 345                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 8.1 |    | 2.88  | 105  | 36.1                            | 23.1                            | 46                              | -  | 94.3                             |
|    | 375                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 29    | 8.1 |    | 2.27  | 103  | 22.4                            | 19.3                            | 70.8                            | -  | 95.9                             |

## 121 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | D-S(sum) | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 26    | 7.9 |     | 220   | 122  | 107                             | 7.91                            | 7.61                            | 92.7     | 37.1   | 55.6                             |
|    | 15                 | 27    | 8.4 |     | 229   | 102  | 99.1                            | -                               | -                               | 92.9     | 35.2   | 57.7                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
| 硝化 | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.1 | 0.1 | 231   | 97.8 | 93.2                            | 0.09                            | -                               | 93.1     | 34.9   | 58.2                             |
|    | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 150                | 30    | 8.1 | 7.9 | 146   | 98   | 99.0                            | 0.60                            | -                               | 90.0     | -  | 90.0                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 180                | 30    | 8.0 | 3.3 | 3.28  | 94   | 87.8                            | 10.78                           | 2.70                            | 91.1     | -  | 91.1                             |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 270                | 30    | 8.0 | 2.7 | 2.99  | 83   | 44.8                            | 30.6                            | 19.0                            | 86.1     | -  | 86.1                             |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.1 | 3.3 | 2.96  | 81   | 28.2                            | 32.0                            | 29.0                            | 88.2     | -  | 88.2                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 330                | 29    | 8.1 | 2.8 | 2.54  | 79   | 15.2                            | 31.0                            | 42.1                            | 91.7     | -  | 91.7                             |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 8.1 | 3.4 | 3.55  | 86   | 19.3                            | 25.7                            | 55.3                            | 89.6     | -  | 89.6                             |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |          |  |                                  |
|    | 420                | 29    | 8.3 | 6.5 | 2.63  | 98   | 9.80                            | 7.5                             | 86.9                            | 92.8     | -  | 92.8                             |

### 133 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 25    | 7.6 |    | 55    | 136  | 112                             | 9.6                             | 13.5                            | 37.5   | 54.5                             |
|    | 15                 | 25    | 8.4 |    | 17    | 109  | 103                             | -0.70                           | -                               | 34.9   | 56.2                             |
|    | 30                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 120                | 29    | 8.1 |    | 25.6  | 102  | 94.1                            | -0.9                            | -                               | 34.1   | 57.9                             |
|    | 135                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 150                | 29    | 8.0 |    | 3     | 102  | 99.7                            | 0.61                            | -                               | -  | 85.7                             |
|    | 165                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                | 29    | 8.1 |    | 2     | 99   | 82.6                            | 9.14                            | 4.16                            | -  | 85.6                             |
|    | 195                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 29    | 8.1 |    | 4     | 85   | 47.3                            | 21.6                            | 22.4                            | -  | 87.9                             |
|    | 285                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 29    | 8.1 |    | 4     | 83   | 34.0                            | 23.4                            | 31.4                            | -  | 88.6                             |
|    | 315                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                | 29    | 8.1 |    | 3.75  | 83   | 29.7                            | 22.9                            | 42.8                            | -  | 89.5                             |
|    | 345                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                | 29    | 8.1 |    | 4.78  | 86   | 13.7                            | 19.8                            | 55.5                            | -  | 90.1                             |
|    | 375                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                |       |     |    | 7.97  | 100  | 3.78                            | 10.3                            | 80.2                            | -  | 91.2                             |

### 145 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 15                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 30                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 120                | 30    | 8.1 |    |       | 100  | 107                             | 0                               | -                               | 29.0   | 54.5                             |
|    | 135                | 30    | 8.2 |    |       |      |                                 |                                 |                                 | -  | 75.6                             |
|    | 150                | 30    | 8.1 |    |       | 102  | 116.3                           | 2.25                            | -                               | -  | 74.6                             |
|    | 165                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.1 |    |       | 82.8 | 51.3                            | 41.2                            | 24.0                            | -  | 81.8                             |
|    | 315                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.2 |    |       | 104  | 4.60                            | 31.5                            | 68.2                            | -  | 85.2                             |

## 152 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 26    | 7.9 |    |       | 149  | 125                             | 16.2                            | 7.49                            | 37.5   | 52.2                             |
|    | 15                 | 27    | 8.6 |    |       | 131  | 129                             | 2.38                            | -                               | 32.3   | 55.1                             |
|    | 30                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.4 |    |       | 118  | 118                             | 0.13702                         | -                               | 27.5   | 58.5                             |
|    | 135                | 30    | 8.4 |    |       |      |                                 |                                 | -                               | -  | 77.9                             |
|    | 150                | 30    | 8.4 |    |       | 135  | 130                             | 2.69                            | 2.10                            | -  | 76.5                             |
|    | 165                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.2 |    |       | 124  | 78.4                            | 15.2                            | 30.1                            | -  | 83.8                             |
|    | 315                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.2 |    |       | 134  | 55.5                            | 12.4                            | 66.2                            | -  | 89.5                             |

## 159 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 26    | 8.2 |    | 206   | 186  | 152                             | 10.7                            | -                               | 38.7   | 61.9                             |
|    | 15                 | 26    | 8.2 |    | 223   | 168  | 224                             | 1.57                            | -                               | 32.9   | 66.0                             |
|    | 30                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 29    | 8.5 |    | 221   | 162  | 197                             | -                               | -                               | 27.2   | 70.7                             |
|    | 135                | 29    | 8.4 |    |       |      |                                 |                                 | -                               | -  | 91.4                             |
|    | 150                | 29    | 8.5 |    | 199   | 159  | 190.7                           | 1.94                            | -                               | -  | 88.7                             |
|    | 165                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 29    | 8.4 |    | 140   | 154  | 123.3                           | 10.2                            | 20.4                            | -  | 96.2                             |
|    | 315                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 29    | 8.3 |    | 56.20 | 154  | 84.99                           | 10.9                            | 43.2                            | -  | 101.5                            |



## 166 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 27    | 8.2 |    | 71.1  | 173  | 170                             | 2.9                             | -                               | 38.4   | 54.2                             |
|    | 15                 | 28    | 8.3 |    | 66.3  | 172  | 172                             | -                               | -                               | 37.8   | 55.1                             |
|    | 30                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.3 |    | 67.8  | 170  | 170                             | -                               | -                               | 33.7   | 59.2                             |
|    | 135                | 30    | 8.4 |    | 47.4  |      |                                 | -                               | -                               | 20.0   | 71.1                             |
|    | 150                | 30    | 8.5 |    | 27.2  | 162  | 162                             | -                               | -                               | 6.09   | 81.5                             |
|    | 165                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.5 |    | 1.84  | 166  | 148.4                           | 11.2                            | 6.63                            | -  | 89.6                             |
|    | 315                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |    |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.5 |    | 2.93  | 165  | 134.0                           | 17.0                            | 13.6                            | -  | 90.4                             |

## 174 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  |       |     |     | 50.7  | 158  | 151                             | 7.2                             | -                               | 41.3   | 50.8                             |
|    | 15                 |       |     |     | 36.7  | 146  | 146                             | 0.15                            | -                               | 38.5   | 53.3                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.1 | 1.2 | 36.5  | 146  | 146                             | 0.04                            | -                               | 35.3   | 56.3                             |
|    | 135                | 30    | 8.3 | 0.7 | 14.1  |      |                                 |                                 | -                               | 28.4   | 63.0                             |
|    | 150                | 30    | 8.4 | 0.8 | 0.94  | 140  | 140                             | -                               | -                               | 15.9   | 74.4                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     | 3.6 |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     | 3.9 |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.2 | 4.3 | 0.84  | 136  | 103                             | 24.1                            | 9.0                             | -  | 87.7                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.1 | 4.6 | 1.8   | 144  | 83.90                           | 39.8                            | 19.9                            | -  | 88.2                             |

### 181 日目

| 工程  | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|-----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 無酸素 | 0                  | 26    | 8.1 |     | 159   | 132  | 113                             | 26.3                            | -                               | 38.7   | 50.3                             |
|     | 15                 | 27    | 8.6 |     | 176   | 98.9 | 95                              | -                               | -                               | 34.6   | 54.0                             |
|     | 30                 | 28    | 8.5 | 0.1 |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 120                | 30    | 8.3 | 0.2 | 191   | 96.5 | 92.4                            | -                               | -                               | 34.7   | 54.7                             |
|     | 135                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 好気  | 150                | 30    | 8.2 | 1.2 | 164   | 92.5 | 89.3                            | 1.73                            | -                               | -  | 85.2                             |
|     | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 180                | 30    | 8.0 | 1.3 | 161   | 93.6 |                                 |                                 | -                               | -  | 86.2                             |
|     | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 300                | 30    | 8.1 | 2.6 | 150   | 91.8 | 35.9                            | 59.0                            | 6.2                             | -  | 86.2                             |
|     | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 420                | 30    | 8.4 | 5.9 | 107   | 96.0 | 9.97                            | 69.6                            | 23.5                            | -  | 86.5                             |

### 187 日目

| 工程  | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|-----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 無酸素 | 0                  | 28    | 8.1 |     | 164.0 | 116  | 100                             | 15.4                            | -                               | 40.0   | 55.5                             |
|     | 15                 | 29    | 8.6 | 0.1 | 160.6 | 88.3 | 88                              | -                               | -                               | 36.5   | 58.4                             |
|     | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 120                | 30    | 8.5 | 0.2 | 120   | 93.7 | 93.7                            | -                               | -                               | 36.4   | 59.0                             |
|     | 135                | 30    | 8.4 | 0.5 |       |      |                                 |                                 | -                               | 27.0   | 65.4                             |
| 好気  | 150                | 30    | 8.3 | 1.2 | 3.46  | 84.8 | 83.4                            | 1.41                            | -                               | -  | 86.7                             |
|     | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 180                | 30    | 8.0 | 0.9 | 4.15  |      |                                 |                                 | -                               | -  | 85.4                             |
|     | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 300                | 30    | 8.1 | 1.0 | 4.18  | 103  | 28.1                            | 72.0                            | 3.1                             | -  | 87.6                             |
|     | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|     | 420                | 30    | 8.6 | 6.5 | 4.2   | 101  | 4.10                            | 78.1                            | 18.8                            | -  | 92.5                             |

## 194 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 27    | 8.0 |     | 26.6  | 106  | 97                              | 9.3                             | -                               | 37.9   | 55.9                             |
|    | 15                 | 29    | 8.4 | 0.2 | 19.0  | 98   | 98                              | -                               | -                               | 34.3   | 58.1                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.3 | 0.1 | 16.9  | 96.0 | 96.0                            | -                               | -                               | 34.8   | 59.2                             |
|    | 135                | 30    | 8.4 | 1.0 | 1.4   |      |                                 |                                 | -                               | 22.5   | 66.3                             |
|    | 150                | 30    | 8.3 | 1.1 | 2.70  | 90.0 | 89.6                            | 0.40                            | -                               | -  | 82.7                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.0 | 1.3 | 2.53  | 83.0 | 17.9                            | 62.1                            | 3.0                             | -  | 86.2                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.5 | 5.9 | 3.0   | 91.5 | -                               | 78.8                            | 12.7                            | -  | 86.5                             |

## 201 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 30    | 7.6 |     | 33.1  | 132  | 125                             | 6.9                             | -                               | 43.5   | 50.2                             |
|    | 15                 | 30    | 8.0 |     | 25.1  | 124  | 124                             | -                               | -                               | 41.6   | 50.3                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.1 | 0.9 | 14.4  | 122  | 122                             | 0.3                             | -                               | 38.9   | 48.8                             |
|    | 135                | 30    | 8.4 | 0.8 | 3.4   |      |                                 |                                 | -                               | 25.3   | 57.3                             |
|    | 150                | 30    | 8.5 | 0.8 | 0.94  | 122  | 121                             | 0.29                            | -                               | -  | 72.9                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.5 | 0.9 | 1.13  | 109  | 64.8                            | 44.2                            | -                               | -  | 87.8                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.4 | 1.2 | 1.1   | 104  | 6.02                            | 94.7                            | 3.3                             | -  | 90.8                             |

## 208 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 26    | 8.2 | 0.1 | 240.6 | 128  | 114                             | 13.3                            | -                               | 40.5   | 55.9                             |
|    | 15                 | 27    | 8.4 | 0.1 | 240.0 | 108  | 108                             | -                               | -                               | 36.5   | 58.8                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.3 | 1.6 | 208   | 112  | 112                             | -                               | -                               | 24.6   | 67.0                             |
|    | 135                | 30    | 8.3 | 2.4 | 1.88  |      |                                 |                                 | -                               | -  | 82.1                             |
|    | 150                | 30    | 8.2 | 1.5 | 2.08  | 108  | 104.9                           | 2.76                            | -                               | -  | 84.7                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.1 | 2.0 | 7.81  | 105  | 50.9                            | 53.6                            | -                               | -  | 89.0                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.4 | 6.5 | -     | 105  | 9.44                            | 88.9                            | 6.80                            | -  | 91.9                             |

## 215 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 27    | 8.0 |     |       | 124  | 136                             | 13.6                            | -                               | 44.1   | 50.9                             |
|    | 15                 | 28    | 8.4 | 0.3 |       | 106  | 105                             | -                               | -                               | 41.8   | 52.5                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.3 | 0.3 |       | 107  | 107                             | -                               | -                               | 40.9   | 53.9                             |
|    | 135                | 30    | 8.3 | 1.4 |       | 106  |                                 |                                 | -                               | 15.3   | 72.0                             |
|    | 150                | 30    | 8.2 | 2.6 |       | 105  | 105.1                           | 0.49                            | -                               | -  | 84.7                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.1 | 1.8 |       | 99   | 47.0                            | 51.8                            | 2.9                             | -  | 87.2                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.2 | 4.6 |       | 108  | -                               | 95.4                            | 5.5                             | -  | 91.9                             |

## 223 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 28    | 8.3 |     |       | 110  | 100                             | 2.76                            | -                               | 38.9   | 55.0                             |
|    | 15                 | 29    | 8.4 |     |       | 104  | 107                             | -                               | -                               | 38.5   | 55.9                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.3 | 0.3 |       | 103  | 95                              | -                               | -                               | 36.7   | 58.3                             |
|    | 135                | 30    | 8.3 | 1.0 |       | 104  |                                 | -                               | -                               | 19.0   | 71.3                             |
|    | 150                | 30    | 8.2 | 1.6 |       | 99.4 | 93.8                            | -                               | -                               | -  | 85.7                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                | 30    | 8.1 | 1.7 |       | 93.4 | 52.6                            | 39.2                            | -                               | -  | 89.1                             |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.4 | 5.9 |       | 100  | 2.97                            | 90.1                            | 6.4                             | -  | 90.7                             |

## 229 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 27    | 8.1 |     |       | 130  | 120                             | 13.7                            | -                               | 48.3   | 60.2                             |
|    | 15                 | 28    | 8.5 |     |       | 111  | 113                             | -                               | -                               | 45.5   | 61.6                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.3 | 0.3 |       | 109  | 102.0                           | -                               | -                               | 45.6   | 62.7                             |
|    | 135                | 30    | 8.2 | 1.7 |       | 109  |                                 | -                               | -                               | 23.8   | 80.1                             |
|    | 150                | 30    | 8.1 | 1.2 |       | 106  | 105.2                           | -                               | -                               | -  | 99.1                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.1 |     |       | 95   | 37.3                            | 54.4                            | -                               | -  | 99.1                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.5 | 6.8 |       | 98   | -                               | 90.7                            | 5.3                             | -  | 101.8                            |

## 243 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 28    | 8.1 | 0.2 | 56.5  | 142  | 134                             | 7.9                             | -                               | 41.6   | 55.0                             |
|    | 15                 | 28    | 8.3 | 0.3 | 32.2  | 102  | 102                             | -                               | -                               | 39.6   | 56.2                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 120                | 30    | 8.3 | 0.2 | 1.30  | 102  | 102                             | -                               | -                               | 39.52  | 56.71                            |
|    | 135                | 30    | 8.2 | 1.0 | 4.32  |      |                                 | -                               | -                               | 15.0   | 74.8                             |
|    | 150                | 30    | 8.1 | 1.0 | 1.63  | 87.3 | 84.3                            | 3.05                            | -                               | -  | 87.2                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.1 | 1.5 | 2.74  | 82.5 | 19.3                            | 63.3                            | -                               | -  | 84.3                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.6 | 6.4 | 1.2   | 87.4 | -                               | 83.0                            | 4.5                             | -  | 89.7                             |

## 257 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN<br>(sum) | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 28    | 8.0 | 0.2 | 249   | 123           | 113                             | 9.04                            | -                               | 44.7   | 59.4                             |
|    | 15                 | 28    | 8.4 | 0.2 | 234   | 100           | 100                             | -                               | -                               | 42.3   | 61.3                             |
|    | 30                 |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 45                 |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 120                | 30    | 8.4 | 0.2 | 53.7  | 89.8          | 89.8                            | -                               | -                               | 42.8   | 61.7                             |
|    | 135                | 30    | 8.3 | 0.8 | 5.90  |               |                                 | -                               | -                               | 21.2   | 76.4                             |
|    | 150                | 30    | 8.2 | 1.5 | 4.60  | 93.1          | 91.0                            | 2.13                            | -                               | -  | 92.9                             |
|    | 165                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 30    | 8.0 | 1.0 | 5.92  | 80.9          | 20.3                            | 60.6                            | -                               | -  | 93.8                             |
|    | 315                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |               |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 30    | 8.6 | 6.4 | 3.54  | 88            | -                               | 88.0                            | -                               | -  | 96.3                             |

## 271 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 27    | 8.1 | 0.8 | 73.7  | 119  | 107                             | 11.5                            | -                               | 42.7   | 64.2                             |
|    | 15                 | 27    | 8.4 | 0.6 | 42.6  | 101  | 101                             | -                               | -                               | 38.2   | 65.7                             |
|    | 30                 | 28    | 8.5 | 0.3 | 29.1  |      |                                 |                                 |                                 | 38.1   | 66.3                             |
|    | 45                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 60                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 29    | 8.4 | 0.1 | 3.44  | 110  | 110                             | -                               | -                               | 37.1   | 67.2                             |
|    | 135                | 30    | 8.3 | 1.0 | 3.73  |      |                                 |                                 |                                 | -  | 92.2                             |
|    | 150                | 29    | 8.0 | 0.7 | 2.37  | 117  | 110.4                           | 6.54                            | -                               | -  | 93.6                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 29    | 8.1 | 0.4 | 5.08  | 101  | 20.9                            | 80.3                            | -                               | -  | 95.8                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 29    | 8.6 | 6.4 | 4.22  | 92.3 | -                               | 88.9                            | 3.35                            | -  | 100.3                            |

## 285 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後<br>min | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
|----|--------------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| 脱窒 | 0                  | 29    | 8.2 | 0.3 | 292   | 113  | 105                             | 7.4                             | -                               | 29.4   | 57.6                             |
|    | 15                 | 29    | 8.3 | 0.2 | 296   | 103  | 100                             | -                               | -                               | 22.2   | 61.6                             |
|    | 30                 | 29    | 8.3 | 0.1 | 293   | 101  |                                 |                                 | -                               | 22.7   | 61.1                             |
|    | 45                 | 30    | 8.3 | 0.1 | 287   | 100  |                                 |                                 | -                               | 22.9   | 62.1                             |
|    | 60                 | 30    | 8.3 | 0.2 | 286   | 100  |                                 |                                 | -                               | 21.6   | 63.1                             |
|    | 75                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90                 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
| 硝化 | 105                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120                | 30    | 8.3 | 0.2 | 269   | 97.2 | 88.7                            | -                               | -                               | 18.1   | 64.2                             |
|    | 135                | 30    | 8.3 | 3.8 | 259   | 98.1 |                                 |                                 | -                               | -  | 76.4                             |
|    | 150                | 31    | 8.1 | 1.0 | 248   | 100  | 89.1                            | 7.43                            | -                               | -  | 78.2                             |
|    | 165                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 255                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300                | 31    | 8.1 | 1.5 | 300   | 89.6 | 8.76                            | 81.2                            | -                               | -  | 80.7                             |
|    | 315                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405                |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420                | 31    | 8.6 | 6.0 | 6.93  | 94.7 | -                               | 90.5                            | 4.27                            | -  | 85.7                             |

# 299 日目

| 工程 | 基質流入<br>終了後 |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|----|-------------|-------|-----|-----|-------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|
|    | min         | temp. | pH  | DO  | D-TOC | D-TN | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S |
| 脱窒 | 0           | 27    | 8.2 | 0.3 | 85.2  | 134  | 121                             | 12.8                            | -                               | 29.9   | 61.5                             |
|    | 15          | 27    | 8.5 | 0.2 | 55.9  | 112  | 112                             | -                               | -                               | 19.9   | 66.6                             |
|    | 30          | 28    | 8.4 | 0.1 | 52.4  |      |                                 |                                 |                                 | 19.5   | 66.8                             |
|    | 45          | 29    | 8.4 | 0.2 | 42.1  |      |                                 |                                 |                                 | 19.4   | 67.5                             |
|    | 60          |       |     |     | 20.2  |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 75          |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 90          |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 105         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 120         | 30    | 8.4 | 0.2 | 3.99  | 107  | 107                             | -                               | -                               | 18.0   | 67.8                             |
|    | 135         | 30    | 8.4 | 2.0 | 2.11  |      |                                 |                                 | -                               | -  | 79.4                             |
| 硝化 | 150         | 30    | 8.2 | 1.2 | 3.74  | 103  | 94.7                            | 8.58                            | -                               | -  | 82.1                             |
|    | 165         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 180         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 195         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 210         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 225         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 240         | 30    | 8.1 | 1.9 |       |      | 34.4                            | 61.5                            | -                               | -  | 80.8                             |
|    | 255         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 270         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 285         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 300         | 29    | 8.2 | 4.1 | 2.35  | 96.1 | -                               | 96.1                            | -                               | -  | 81.1                             |
|    | 315         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 330         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 345         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 360         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 375         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 390         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 405         |       |     |     |       |      |                                 |                                 |                                 |  |                                  |
|    | 420         | 29    | 8.7 | 7.1 | 4.69  | 110  | 8.58                            | 97.2                            | 3.7                             | -  | 88.1                             |







>TR92 amoA -23

>TR92 amoA -24

>TR92 amoA -25

>TR92 amoA -26

>TR92 amoA -27

>TR92 amoA -28

>TR92 amoA -29

>TR92 amoA -31

>TR92 amoA -32

>TR92 amoA -33

>TR92 amoA -35

>TR92 amoA -36

>TR92 amoA -37

>TR92 amoA -39

>TR92 amoA -40

>TR92 amoA -42

>TR92 amoA -47

>TR92 amoA 48

TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR92\_amoA -50

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR92\_amoA -51

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGG -CATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR92\_amoA -52

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR92\_amoA -53

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCMGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -1

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACSGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -2

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTATTGTCSATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -4

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTNGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTATTGTCSATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -5

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACACCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTCACAATGTATCTGACACGTAACCTGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGCTGCTGTTTACCCGGGTAACCTGGGCGATTTTTGGTCCGACCCATCTGCCGATCGTCGTTGAA  
GGAACACTGCTGTCGATGGCTGACTACATGGGGCATCTGTATGTTCTGTACAGGTACACCGGAGTATGTTCTGATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTATTGCAGCATTTTGCAGCGTTTGATCCATGCTGATGTTACAGTCTGGTGGTATCTGGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCTTTCTTCTACGTTAAAGGTAAAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTTGGT

>TR257\_amoA -6

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACACCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTCACAATGTATCTGACACGTAACCTGGCTGGT

AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCGGGTAAC TGGGCGATTTTGGTCCGACCCATCTGCCGATCGTCSTGGAA  
GGAACACTGCTGTCSATGGCTGACTACATGGGGCATCTGTATGTTCTGTACAGGTACACCGGAGTATGTTCTGTATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGKGGTCACACCACAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGTATCCATGCTGATGTTACAGCTCTGGTGGTATCTTGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCCTTCTTCTACGTTAAAGGTAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTGGT

>TR257\_amoA -8

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACTTATTGTCSATGGCTGATTATATGGGTACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTACATACCAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGKCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -9

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACACCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTCACAATGTATCTGACACGTAAC TGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCGGGTAAC TGGGCGATTTTGGTCCGACCCATCTGCCGATCGTCGTGGAA  
GGAACACTGCTGTCSATGGCTGACTACATGGGGCATCTGTATGTTCTGTACAGGTACACCGGAGTATGTTCTGTATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTACACACCAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGTATCCATGCTGATGTTACAGCTCTGGTGGTATCTTGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCCTTCTTCTACGTTAAAGGTAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTGGT

>TR257\_amoA -10

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACTTATTGTCSATGGCTGATTATATGGGTACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTACATACCAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -11

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACTTATTGTCSATGGCTGATTATATGGGTACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTACACACCAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -12

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACTTATTGTCSATGGCTGATTATATGGGTACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTACATACCAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGATTGTACMTAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -13

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACSGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACTTATTGTCSATGGCTGATCATATGGGTACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTACACACCAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -14

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACACCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTCACAATGTATCTGACACGTAAC TGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCGGGTAAC TGGGCGATTTTGGTCCGACCCATCTGCCGATCGTCGTGGAA  
GGAACACTGCTGTCSATGGCTGACTACATGGGGCATCTGTATGTTCTGTACAGGTACACCGGAGTATGTTCTGTATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTACACACCAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGTATCCATGCTGATGTTACAGCTCTGGTGGTATCTTGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCCTTCTTCTACGTTAAAGGTAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTGGT

>TR257\_amoA -15

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACSGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACTTATTGTCSATGGCTGATTATATGGGTACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTACATACCAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCCTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -16

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT

TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTTCGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTNGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -17

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTTCGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTAGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -18

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACGCCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTCACAATGTATCTGACACGTAAGTGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCGGGTAAGTGGGCGATTTTTGGTCCGACCATCTGCCGATCGTCTGGAA  
GGAACACTGCTGTGATGGCTGACTACATGGGTCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCGGAGTATGTTTCGTATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGATCCATGCTGATGTTTCAGAGTCTGGTGGTATCTGGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCTTTCTTCTACGTAAAGGTAAAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTGTTGGT

>TR257\_amoA -19

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACGCCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTCACAATGTATCTGACACGTAAGTGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCGGGTAAGTGGGCGATTTTTGGTCCGACCATCTGCCGATCGTCTGGAA  
GGAACACTGCTGTGATGGCTGACTACATGGGTCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCGGAGTATGTTTCGTATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGATCCATGCTGATGTTTCAGAGTCTGGTGGTATCTGGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCTTTCTTCTACGTAAAGGTAAAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTGTTGGT

>TR257\_amoA -21

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GAGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTTCGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -22

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCMATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTTCGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -23

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACGCCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTCACAATGTATCTGACACGTAAGTGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCGGGTAAGTGGGCGATTTTTGGTCCGACCATCTGCCGATCGTCTGGAA  
GGAACACTGCTGTGATGGCTGACTACATGGGTCATCTGTATGTTTCGTACAGGTACACCGGAGTATGTTTCGTATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGATCCATGCTGATGTTTCAGAGTCTGGTGGTATCTGGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCTTTCTTCTACGTAAAGGTAAAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTGTTGGT

>TR257\_amoA -24

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGKTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTTCGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -25

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTTCGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -26

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACGCCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTCACAATGTATCTGACACGTAAGTGGCTGGT

AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCCGGGTAAGTGGGCGATTTTTGGTCCGACCCATCTGCCGATCGTCSTGGAA  
GGAACACTGCTGTCGATGGCTGACTACATGGGGCATCTGTATGTTCTGTACAGGTACACCGGAGTATGTTCTGTATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGTATCCATGCTGATGTTACAGTCTGGTGGTATCTTGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCCTTCTTCTACGTAAAGGTAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTGGT

>TR257\_amoA -27

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACACCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTTCACAATGTATCTGACACGTAAGTGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCCGGGTAAGTGGGCGATTTTTGGTCCGACCCATCTGCCGATCGTCSTGGAA  
GGAACACTGCTGTCGATGGCTGACTACATGGGGCATCTGTATGTTCTGTACAGGTACACCGGAGTATGTTCTGTATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGTATCCATGCTGATGTTACAGTCTGGTGGTATCTTGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCCTTCTTCTACGTAAAGGTAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTGGT

>TR257\_amoA -28

CGCATTATCCAATCAACTTTGTAACGCGGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGTATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGGCGATTGTAGTAGAA  
GGGCATTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTCTATGCTGGTATTTTTGGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -29

CGCATTATCCAATCAACTTTGTAACGCGGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGTATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGGCGATTGTAGTAGAA  
GGGCATTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTCTATGCTGGTATTTTTGGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -30

CGCATTATCCAATCAACTTTGTAACGCGGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGTATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGGCGATTGTAGTAGAA  
GGGCATTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTCTATGCTGGTATTTTTGGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -32

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACACCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTTCACAATGTATCTGACACGTAAGTGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCCGGGTAAGTGGGCGATTTTTGGTCCGACCCATCTGCCGATCGTCSTGGAA  
GGAACACTGCTGTCGATGGCTGACTACATGGGGCATCTGTATGTTCTGTACAGGTACACCGGAGTATGTTCTGTATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGTATCCATGCTGATGTTACAGTCTGGTGGTATCTTGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCCTTCTTCTACGTAAAGGTAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTGGT

>TR257\_amoA -33

CGCATTATCCAATCAACTTTGTAACGCGGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGTATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGGCGATTGTAGTAGAA  
GGGCATTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTCTATGCTGGTATTTTTGGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -34

CGCATTATCCAATCAACTTTGTAGCGCGGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGTATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGGCGATTGTAGTAGAA  
GGGCATTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTCTATGCTGGTATTTTTGGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -35

CGCATTATCCAATCAACTTTGTAACGCGGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGTATTTAACACGTAATTTTTGAT  
TACGGCGTACTTGGTGGTGCATTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGGCGATTGTAGTAGAA  
GGGCATTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTGCATCGTTTGTCTATGCTGGTATTTTTGGTGGTGGTATCTGGGTAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTGGT

>TR257\_amoA -36

CGCATTATCCAATCAACTTTGTAACGCGGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGTATTTAACACGTAATTTTTGAT



TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTACTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -37

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -38

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -39

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -40

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACGCCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTTCACAATGTATCTGACACGTAACCTGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCGGGTAACCTGGGCGATTTTTGGTCCGACCATCTGCCGATCGTCGTGGAA  
GGAACACTGCTGTCGATGGCTGACTACATGGGGCATCTGTATGTTCTGTACAGGTACACCGGAGTATGTTCTGTCATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGATCCATGCTGATGTTACAGCTCTGGTGGTATCTTGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCCTTTCTTCTACGTTAAAGGTAAAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTTTGGT

>TR257\_amoA -42

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -49

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -50

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT  
TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACCTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTCACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTTCTATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTCGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

>TR257\_amoA -51

CACACTATCCAATCAACTTTGTAACGCCGGGCATTATGCTTCCGGGTGCATTGATGCTGGATTTTCACAATGTATCTGACACGTAACCTGGCTGGT  
AACTGCACTGGTTGGAGGCGGATTCTTTGGTCTGCTGTTCTACCGGGTAACCTGGGCGATTTTTGGTCCGACCATCTGCCGATCGTCGTGGAA  
GGAACACTGCTGTCGATGGCTGACTACATGGGGCATCTGTATGTTCTGTACAGGTACACCGGAGTATGTTCTGTCATATTGAGCAAGGTTTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCACACCACAGTGATTGCAGCATTCTTTGCAGCGTTTGATCCATGCTGATGTTACAGCTCTGGTGGTATCTTGAAAAAGT  
TTTCTGCACAGCCTTTCTTCTACGTTAAAGGTAAAAGAGGACGGATCGTACAACGCAATGATGTTACGGCATTTTGGT

>TR257\_amoA -52

CGCATTATCCACTCAACTTTGTAACGCCGGGCATCATGCTTCCAGGTGCGTTGATGTTGGATCTGACCTTGATTTAACACGTAATTTTTTGAT

TACGGCGCTACTTGGTGGTGCATTTTTTGGTTTATTGTTCTATCCGGGCAACTGGCCAATATTTGACCTACACACTTGCCGATTGTAGTAGAA  
GGGCACTTATTGTCGATGGCTGATTATATGGGTACATGTACGTTCTGTACAGGTACACCAGAATACACGCGCTTGATTGAGAAAGGGTCATTAC  
GTACCTTTGGTGGTCATACCACAGTAATTGCGGCATTTTTTGCATCGTTTGTTCATGCTGGTATTTTTGGTGTGGTGGTATCTGGGTAAAGT  
CTATTGCACAGCTTCTTCTATGTCAAAGGTAAAAGAGGTGCGATTGTACATAGAGAAGACGTGACTGCATTTGGT

### ***Nitrobacter* 16S rDNA(FGPS872f-1269r)-Clone 塩基配列**

>TR92\_FGPS -01

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -09

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -11

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -14

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -18

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -19

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -20

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACGACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -21

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -22

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -24

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCAGAGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGTCTTGTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCT  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGCTACAATGGCCGGTGACAATGGGAAGCAAGGGGTGACCC

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCAGAGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCCGTCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCT  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAGGGGTGACCC

CGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAA -GCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGAGCATGGAGCAGAGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCCGTCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGCTACAATGGCGTGACAATGGGAAGCAAGGGGTGACCC

CGGGCCCCGCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTCGCAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGCGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCCGTCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAGGGGTGACCC

CGGGACCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCCGTCTTGTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAGGGGTGACCC

CGGGACCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGCTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

CGGGGGCCCGCAGCAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGC  
AACCCCGCTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAGGGGTGACCC

CGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGC  
AACCCTTCTCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

CGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGC  
AACCCTTGCTCCTTAGTTGCTACCACTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGTTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGACACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTTTCGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGC  
AACCCTCGTCCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

CGGGGGCCGCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTGCGAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGATGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGC  
AACCCTGCTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGCCCTC  
ATGGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -44

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTCGCAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC

>TR92\_FGPS -45

CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCATGACCGGTCGCAGAG  
ATGTGACCTTCTCTTCGGAGCATGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCAC  
AACCCCCGTCCTTGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC  
ATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGAAGCAAAGGGGTGACCC