

長岡技術科学大学大学院
工学研究科 博士論文

閉鎖循環式魚類飼育のための生物学的窒素除去技術の開発

令和4年3月

エネルギー・環境工学専攻 中村 嘉伸

主査 山口 隆司 教授
副査 牧 慎也 准教授
副査 幡本 将史 准教授
副査 川上 周司 准教授（長岡工業高等専門学校）
副査 竹内 裕 教授（金沢大学）

目次

第1章 序論.....	4
1.1 研究の背景と目的.....	4
1.2 本論文の構成.....	6
参考文献.....	7
第2章 既往の知見.....	10
2.1 窒素除去を中心とした水処理技術.....	10
2.2 養殖技術の現状.....	12
2.3 閉鎖循環式陸上養殖水槽を対象とした水処理技術.....	13
2.4 藻類等を用いた窒素除去.....	16
2.5 小括.....	18
参考文献.....	18
第3章 DHS-USB システムを用いた閉鎖循環型陸上養殖システムの開発.....	22
3.1 はじめに.....	22
3.2 実験方法.....	22
3.2.1 実験装置と操作方法.....	22
3.2.2 <i>E. bruneus</i> の飼育条件.....	25
3.2.3 水質分析.....	25
3.2.4 16S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物解析.....	26
3.3 実験結果および考察.....	27
3.3.1 養殖水槽の水質.....	27
3.3.2 DHS-USB システムの処理性能.....	29
3.3.3 DHS リアクターの微生物群集構造.....	32
3.3.4 USB リアクターの微生物群集構造.....	35

3.3.5 閉鎖循環型陸上養殖システムにおける <i>E. bruneus</i> の成長	37
3.4 小括.....	38
参考文献	38
第4章 微細藻類-細菌共生系プロセスとバッフルドリアクターによる新規窒素除去システムの開発	43
4.1 はじめに.....	43
4.2 実験方法.....	43
4.2.1 フォト・バッフルド・リアクターのシステムの説明.....	43
4.2.2 合成廃水	44
4.2.4 運転条件	45
4.2.3 分析方法	46
4.2.4 統計解析	47
4.3 実験結果および考察	47
4.3.1 フォトバッフルドリアクターのプロセス性能.....	47
4.3.2 フォトバッフルドリアクターの水質プロファイル	49
4.4 小括	51
参考文献	52
第5章 総括.....	55
5.2 微細藻類-細菌共生系プロセスとバッフルドリアクターによる新規窒素除去システムの開発のまとめ.....	55
5.3 課題と今後の展望	56

謝辞

第1章 序論

1.1 研究の背景と目的

閉鎖循環型陸上養殖システム (RAS: Recirculating Aquaculture System) は、水資源が制限された状況で安全で健康的な高品質の水産物を生産することができる集約的な魚類養殖技術である。閉鎖循環型陸上養殖システムでは、高効率の水処理工程を使用して最大 90~99%の水が再利用される。この革新的な養殖方法は、食糧問題の解決のために応用される事例が増えており、このことは世界各地で行われた複数の先行研究によっても示されている (Badiola et al., 2012)。閉鎖循環型陸上養殖システムがその応用に関して直面している主な問題は、高密度の条件下で魚類の生存を確保するための厳格な水質管理である。閉鎖循環型陸上養殖システム内の水質が悪化するとすべての養殖魚が死滅してしまう。

一方で、収益性を高めるためには、魚体密度が高い状態で閉鎖循環型陸上養殖システムを運用する必要がある。現在、糞や残餌などの固形物、アンモニア、亜硝酸、硝酸などの有害物質を養殖用水から除去するために、機械的および生物学的な水処理工程が用いられている。アンモニアは魚の成長にとって非常に有害であり、高密度条件の養殖水槽において蓄積量が $1.0 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ を超えないようにする必要がある。そのため、閉鎖循環型陸上養殖システムの高密度化を実現するためには、養殖用水から迅速にアンモニアを除去する必要がある。

閉鎖循環型陸上養殖システムでは、アンモニアを生物学的に酸化して毒性の低い硝酸塩に変換する生物学的硝化工程が広く用いられている。この生物学的硝化工程は好気性アンモニア酸化細菌 (AOB: ammonia oxidizing bacteria)、アンモニア古細菌 (AOA: ammonia oxidizing archaea)、および好気性亜硝酸酸化細菌 (NOB: nitrite oxidizing bacteria) によって行われる。これらの硝化細菌は、懸濁液中または固定された基質上で増殖させることができる (Ruiz et al., 2019)。アンモニアを除去し、閉鎖循環型陸上養殖システムの水質を維持しつつ硝化細菌を保持するために、砂フィルター、流動床式バイオフィルター、移動床式フィルター、固定床式フィルター、トリッキングフィルター、回転式生物学的接触器などを備えた生物濾過システムが広く使用されている (Badiola et al., 2012)。

砂フィルターは、少ない汚染量、単純な構造、高い懸濁物質除去率、効果的な逆洗リサイクル、小さな設置面積などの利点があるため、閉鎖循環型陸上養殖システムで一般的に使用されている。しかしながら、砂フィルターでは定期的なフラッシング防止、高

いフラッシング圧力、硬化しやすい濾材など、その運用には複雑な維持管理が求められる。さらに、これらのフィルターは、表面に浮遊する泥を適時に排除し水処理システムを維持するために、頻繁に点検しなければならない。頻繁な維持管理と高い運用コストにより、砂フィルターは高密度の閉鎖循環型陸上養殖システムには適していない。

養殖水が分配装置を介してバイオリアクターに流入し、バイオフィルム上に流れ込む散水ろ床法（TF: trickling filter）は、大きな比表面積や長期間にわたる耐久性を提供し、運用コストを低く抑えることができるため、閉鎖循環型陸上養殖システムにとって有望なシステムである（Xiao et al., 2019）。プラスチックを中心とした数種類のバイオマス保持型担体が提案され、その工程性能が実証されている（Godoy-Olmos et al., 2016）。

下降流懸垂型スポンジ（DHS: down-flow hanging sponge）リアクターは、バイオマス保持型担体として使用されてきた生物学的散水ろ床法であり、発展途上国向けの低コスト下水処理工程として開発されたものである（Hatamoto et al., 2018; Tandukar et al., 2007）。DHS リアクターの最初のプロトタイプでは、小さな立方体のスポンジをナイロン製の紐によって互いに接続させ、斜め方向に一行に配置していた（Hatamoto et al., 2018）。スポンジ担体は、その表面と内側部分における高い微生物の多様性により、他のろ材と比較して高濃度の細菌を保持することができ、余剰汚泥の生成量も極めて低い（Araki et al., 1999; Kubota et al., 2014）。DHS が保持した汚泥について最近行われた微生物群集の構造解析では、スポンジ担体による硝化細菌の保持率が高いことが明らかになった（Kubota et al., 2014; Watari et al., 2020a）。さらに、DHS リアクターは、外部からの空気による曝気を伴わずに高い酸素移動速度を達成していた（Uemura et al., 2016; Watari et al., 2020a）。スポンジ担体の高い汚泥保持能力と酸素移動量は、極めて高い硝化効率を実現できる（Hewawasam et al., 2017）。

アンモニアを酸化して硝化細菌が生成する硝酸塩の毒性はアンモニアと比較すると低いが、高濃度の硝酸塩は魚の成長に影響する（Van Bussel et al., 2012）。硝酸塩を迅速に除去するために、上昇流スラッジブランケット（USB: upflow sludge blanket）リアクターは、上昇流嫌気性スラッジブランケット（UASB: upflow anaerobic sludge blanket）リアクターに基づいて開発された有望なツールである（Chen et al., 2018; Watari et al., 2020b）。脱窒を担う粒状汚泥は、従来の脱窒リアクターと比較して、高濃度のバイオマスを保持しつつリアクターの容積を削減できる（Pagáčová et al., 2010）。我々の研究グループは、海水用の水槽浄水システムにおける硝酸塩除去に DHS リアクターと組み合わせた USB リアクターを使用している（Adlin et al., 2018）。

最近、我々の研究グループは、脱窒用の USB リアクターとともに DHS リアクターを

用いて、淡水および海水の再循環水槽で使用することに成功した (Adlin et al., 2018; Furukawa et al., 2016). Adlin et al. (2018) は、淡水の水槽に使用した DHS-USB システムが、水交換が制限されているにもかかわらず、アンモニアと亜硝酸の量を検出限界の $0.01\text{mg-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下に維持できていることを実証した。さらに、別の DHS-USB システムでは、海水の水槽において高いアンモニア除去率を示し、全アンモニア性窒素 (TAN) と亜硝酸の濃度を $0.01\text{mg-N}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下に維持できていることを実証した (Furukawa et al., 2016). また、アンモニア除去のために低温条件下における単一の DHS リアクターの適用を試みた (Oshiki et al., 2020). しかし、海水閉鎖循環型陸上養殖システムにおける水維持システムとして DHS リアクターを実規模レベルで導入した例は報告されていない。

1.2 本論文の構成

本論文の第1章「序論」では、本研究の背景と目的、本論文の構成を記述した。

第2章「既往の研究」では、窒素除去を中心とした水処理技術、魚類を中心とした養殖技術の現状、閉鎖循環式陸上養殖水槽を対象とした水処理技術、藻類等を用いた窒素除去、に関わる既往の知見について整理し、既往の研究の中での本研究の課題について明らかにした。

第3章「DHS-USB システムを用いた閉鎖循環型陸上養殖システムの開発」では、クエ *Epinephelus bruneus* 養殖のためのパイロットスケール閉鎖循環型陸上養殖システムにおける水浄化システムとして DHS-USB システムを用い、TAN、亜硝酸、硝酸を測定することで、266 日間にわたる魚の生存率と窒素除去性能を評価した。さらに、硝化・脱窒に関わる微生物に対する理解を深めるため、DHS リアクターと USB リアクターに存在する微生物群集の特徴付けも行った。

第4章「微細藻類-細菌共生系プロセスとバッフルドリアクターによる新規窒素除去システムの開発」では、微細藻類-細菌コンソーシアムの窒素除去システムの開発を研究目的として、フォト・バッフルド・リアクターを 30°C の恒温槽で 350 日間運転し、微細藻類-硝化細菌コンソーシアムの窒素除去性能を評価した。

第5章は、本研究の総括として、第3章、第4章で得られた知見、および、本研究で対象とした閉鎖循環型陸上養殖で留意する点および閉鎖循環システムを利用した水管理の提言まとめた。

参考文献

Adlin, N., Matsuura, N., Ohta, Y., Hirakata, Y., Maki, S., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., 2018. A nitrogen removal system to limit water exchange for recirculating freshwater aquarium using DHS-USB reactor. *Environ. Technol.* 39, 1577–1585.

Araki, N., Ohashi, A., Machdar, I., Harada, H., 1999. Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponge-cubes as attachment site. *Water Sci. Technol.* 39, 23–31.

Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J., 2012. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquac. Eng.* 51, 26–35.

Chen, Z., Wang, X., Chen, X., Chen, J., Gu, X., 2018. Rapid start-up and performance of denitrifying granular sludge in an upflow sludge blanket (USB) reactor treating high concentration nitrite wastewater. *Biodegradation* 29, 543–555.

Furukawa, A., Matsuura, N., Mori, M., Kawamata, M., Kusaka, J., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., 2016. Development of a DHS-USB recirculating system to remove nitrogen from a marine fish aquarium. *Aquac. Eng.* 74, 174–179.

Godoy-Olmos, S., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., 2016. Influence of filter medium type, temperature and ammonia production on nitrifying trickling filters performance. *J. Environ. Chem. Eng.* 4, 328–340.

Hatamoto, M., Okubo, T., Kubota, K., Yamaguchi, T., 2018. Characterization of downflow hanging sponge reactors with regard to structure, process function, and microbial community compositions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 10345–10352.

Hewawasam, C., Matsuura, N., Maharjan, N., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., 2017. Oxygen transfer dynamics and nitrification in a novel rotational sponge reactor. *Biochem. Eng. J.* 128, 162–167.

Kubota, K., Hayashi, M., Matsunaga, K., Iguchi, A., Ohashi, A., Li, Y.Y., Yamaguchi, T.,

Harada, H., 2014. Microbial community composition of a down-flow hanging sponge (DHS) reactor combined with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for the treatment of municipal sewage. *Bioresour. Technol.* 151, 144–150.

Oshiki, M., Aizuka, T., Netsu, H., Oomori, S., Nagano, A., Yamaguchi, T., Araki, N., 2020. Total ammonia nitrogen (TAN) removal performance of a recirculating down-hanging sponge (DHS) reactor operated at 10 to 20 °C with activated carbon. *Aquaculture* 520, 734963.

Pagáčová, P., Galbová, K., Drtil, M., Jonatová, I., 2010. Denitrification in USB reactor with granulated biomass. *Bioresour. Technol.* 101, 150–156.

Ruiz, P., Vidal, J.M., Sepúlveda, D., Torres, C., Villouta, G., Carrasco, C., Aguilera, F., Ruiz-Tagle, N., Urrutia, H., 2019. Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *Rev. Aquac.* 1–17.

Tandukar, M., Ohashi, A., Harada, H., 2007. Performance comparison of a pilot-scale UASB and DHS system and activated sludge process for the treatment of municipal wastewater. *Water Res.* 41, 2697–2705.

Uemura, S., Okubo, T., Maeno, K., Takahashi, M., Kubota, K., Harada, H., 2016. Evaluation of water distribution and oxygen mass transfer in sponge support media for a down-flow hanging sponge reactor. *Int. J. Environ. Res.* 10, 265–272.

Van Bussel, C.G.J., Schroeder, J.P., Wuertz, S., Schulz, C., 2012. The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 326–329, 163–167.

Watari, T., Kotcharoen, W., Omine, T., Hatamoto, M., Araki, N., Oshiki, M., Mimura, K., Nagano, A., Yamaguchi, T., 2020a. Formation of denitrifying granules in an upflow sludge blanket reactor with municipal sewage and sodium nitrate feeding. *Environ. Technol. Innov.* 19, 100861.

Xiao, R., Wei, Y., An, D., Li, D., Ta, X., Wu, Y., Ren, Q., 2019. A review on the research status and development trend of equipment in water treatment processes of recirculating aquaculture systems. *Rev. Aquac.* 11, 863–895.

第2章 既往の知見

2.1 窒素除去を中心とした水処理技術

工場や生活排水からの窒素やアンモニア態窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) の除去は、富栄養化の防止や水質保全の観点から非常に重要である。排水中の窒素がもたらす水環境への過剰負荷は富栄養化現象を引き起こし、生態系へ影響を及ぼす。また、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は多くの水生生物に対して高い生物毒性を持っている (Kim et al., 2015; Lemarié et al., 2004)。そのため、排水に含まれる窒素や $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の除去は重要である。窒素の除去は物理化学的処理方法と生物学的処理方法がある。窒素や $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去に広く用いられている生物学的処理方法は硝化脱窒法である。後者は前者より比較的安価であるため、広く用いられている。

生物学的窒素除去手法は、大きく分けて硝化プロセスと脱窒プロセスの2つに分類される。硝化プロセスでは $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を好気条件下で独立栄養細菌のアンモニア酸化細菌 (AOB) や亜硝酸酸化細菌 (NOB) により亜硝酸態窒素 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) や硝酸態窒素 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) まで酸化させる (硝化反応)。脱窒プロセスでは、硝化反応で生成された $\text{NO}_2^-\text{-N}$ や $\text{NO}_3^-\text{-N}$ を嫌気条件下で脱窒細菌により窒素ガスへ還元し (脱窒反応)、窒素を水中から除去する。

近年、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を除去する方法の一つとして、微細藻類と硝化細菌を共生させたプロセスが注目されている。このプロセスでは、高濃度の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を除去することが可能であるため、広く研究が行われている (Rada-Ariza et al., 2017; Subashchandrabose et al., 2011)。微細藻類と硝化細菌を共生させたプロセスでの $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去は、藻類による取り込みと AOB や NOB による硝化反応である。この硝化反応で消費する酸素を藻類の光合成によって補うため、曝気が必要で省エネルギーという利点を有する。この方法では、硝化反応での曝気、脱窒反応での有機物の添加が不必要であるため運転費用も抑えることができる。しかし、微細藻類は小さな粒径 (2-30 μm)、水と同程度の密度、沈降速度が遅いといった特徴をもつため (Cristina González-Fernández et al., 2013)、バイオマスが処理水とともに流出してしまうという問題があるが、福島らによると、簡易的な構造で污泥滞留時間 (Solids retention time: SRT) が長く、高濃度でのバイオマス (微細藻類-硝化細菌が共生した状態) の保持が可能なバツフルドリアクターを用いる方法で、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去率 $66\pm 11\%$ 、窒素の除去率 $30\pm 15\%$ といった高性能の窒素除去法が開発されている (福島ら, 未発表)。それ以外にも、部分的亜硝酸化、硝化脱窒、嫌気性アンモニウム酸化などのプロセスを組み合わせた費用対効果の高い生物学的窒素除去プロセスが開発されている (図 2-1)。

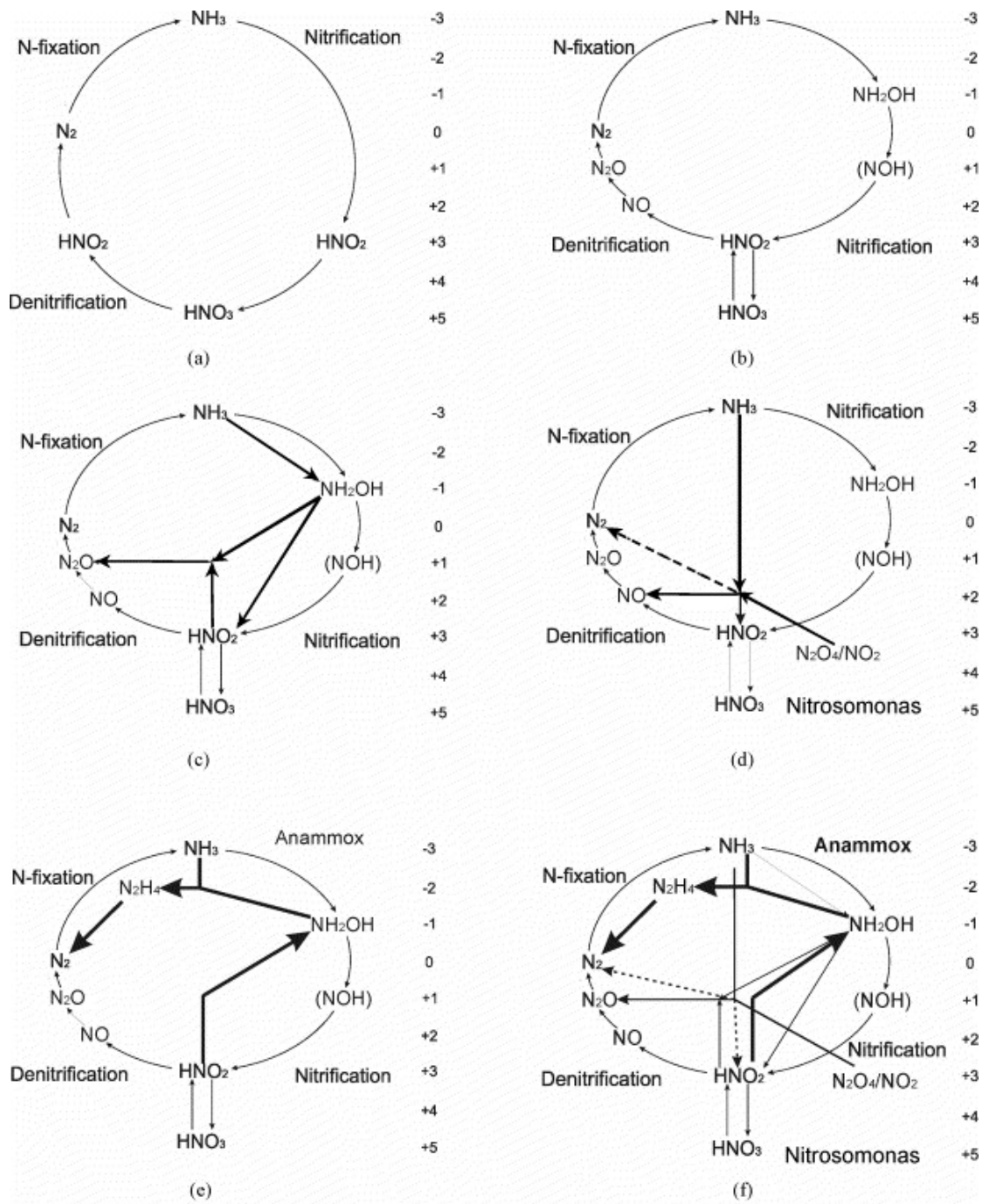


図 2-1 窒素循環

(a) 従来の硝化と脱窒, (b) SHARON (Single reactor High activity Ammonia Removal Over Nitrite) プロセスによる部分硝化, (c) Nitrosomonas による好気性脱窒と好気性脱アンモニア, (d) Nitrosomonas による脱窒, (e) 嫌気性アンモニア酸化, (f) 全体的な窒素除去 (Ahn, 2006)

2.2 養殖技術の現状

家庭や工場から排水される窒素の水環境への過剰負荷は富栄養化現象を引き起こし、生態系へ影響を及ぼす。また、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は多くの水生生物に対して高い生物毒性を持っている (Kim et al., 2015; Lemarié et al., 2004)。そのため、排水に含まれる窒素や $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の除去は重要である。窒素の除去は物理化学的処理方法と生物学的処理方法がある。生物学的処理方法は物理化学的処理方法より比較的安価であるため、広く用いられている。生物学的窒素除去手法は、大きく分けて硝化プロセスと脱窒プロセスの2つに分類される。また、近年では部分的亜硝酸化、硝化脱窒、嫌気性アンモニウム酸化などのプロセスを組み合わせた費用対効果の高い生物学的窒素除去プロセスが開発されている。

魚類の養殖方式は、大きくは海面養殖と陸上養殖の2つに区分される。海面養殖は海や河川に生簀を設置する方式。陸上養殖は海や河川の無い陸上で人工的な環境で養殖を行うもので、大きく分けて「掛け流し式」、「閉鎖循環式」がある。「掛け流し式」による陸上養殖は、自然の水を利用するため、河川岸や沿岸部に限定される。これに対し、「閉鎖循環式」による陸上養殖は、主に硝化細菌と脱窒細菌を用いた微生物による水処理を基本とするもので、これら微生物を維持できれば、自然の水に頼らず、陸上どこでも場所を選ぶ必要の無い養殖が可能となる。日本では「魚離れ」と言われて久しいが、2006年には、魚介類と肉類の摂取量は逆転している。この国内の「魚離れ」に対し、世界的には魚の需要(消費量)は年々増加傾向にあり、特に中国の消費量が急増しているにもかかわらず、世界の漁業による漁獲量は、1990年代を境にして現在までほぼ横ばいである。その一方で、増加する魚の消費に比例して、増加傾向にあるのが養殖生産である。「国連食糧農業機関」は、今後、更に上がる事が予測されている水産物の需要増加に対して、「養殖産業振興」が唯一の手段と述べている。(FAO, 2020)。実際に養殖産業による生産量は2000年代から上昇を続け、漁業生産量と、ほぼ同等かそれ以上となっています。これらの養殖による年間生産量は約7,700万トンで、世界の牛肉生産約7,400万トン、すなわちウシ約10億頭を上回る生産量となっており、今後、更に増える事が予測されています。現在、世界的な人口増加に対して、近い将来起こり得る食糧危機に対し、昆虫食の重要性が高まってきています。こうした世界的な食糧不足の懸念を踏まえ、養殖産業が一層活発化している。その中で特に脚光を浴びているのが、海や河川以外の陸上に水槽を設置し、良質なタンパク源である魚介類を容易に飼育できる陸上養殖である。これは「閉鎖循環式水処理技術」を活用した水産物の養殖方式で、飼育水を再利用するため環境負荷の低減という面でも注目されている。この「閉鎖循環式陸上養殖」のメリットとしては次の点が挙げられる。

- 気候・赤潮・病気等の外的要因による影響がないなど、飼育環境の安定化による生産性の向上

- 高密度養殖による効率的な生産
- 水温調整による，養殖期間の短縮化や出荷時期の調整が可能
- トレーサビリティの対応が容易
- 海上での作業がないなど，作業量の軽減
- 排水がほとんど出ないため，環境への影響が軽微
- 場所の制約が少ない

表 2-1 窒素含有飼育水，養殖水の代表的な水質と，処理後の目標処理水質
(値の単位: mgN/L)

水質 対象	窒素含有飼育水の水質 (処理前)		目標処理水質 (処理後)	
	アンモニア態窒素	硝酸態窒素	アンモニア態窒素	硝酸態窒素
飼育水・ 養殖水	0.1 程度	海獣 : 80 程度 魚類 : 40 程度 軟体生物 : 20 程度	【飼育水として循環使用＝希釈水*】 目標 : 0.1 未満 (海域水質類型 B レベル) *水槽の飼育水と混合後，飼育水が 0.10 程度以下に維持される必要有り	【飼育水として循環使用＝希釈水**】 目標: 1～30 程度 (海域水質類型 B レベル) **水槽の飼育水と混合後，飼育水が海獣で 80, 魚類 40, 軟体生物 20 程度以下に維持される必要有り

2.3 閉鎖循環式陸上養殖水槽を対象とした水処理技術

海洋生物の飼育を対象とした密閉型水槽の水管理技術は，水族館での教育から，陸上養殖による次世代の食料確保等に関係して重要である。しかし，現行の水処理技術は，物理・化学的処理技術を用いてシステムが構成されていることから，イニシャル・ランニングコストが高い等の問題がある (Badiola et al., 2012)。また，海洋生物対象の養殖水槽は，水棲生物を死滅させないために排泄物や残餌に由来するアンモニア態窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)，硝酸態窒素 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) を適切に制御する必要がある (表 2-1)。養殖水槽に

て魚類の養殖を行うために求められる飼育水の水質は、硝酸態窒素濃度で 5~10 mg/L 以下の低レベルである (Neto et al., 2019). そのため、従来の養殖用水槽の水質管理は、毎日「新しい水」を水槽容積の 5~10%程度補給する、いわゆる「掛け流し」による希釈の方法となっている。淡水魚の養殖の場合は、地下水や水道水の取り込みにより「掛け流し」でも適用できる。

一方、海水魚の場合、新鮮な海水が 1 立方メートルあたり 5 千~8 千円と高価であることから「掛け流し」ができず、内陸部での海水魚の人工養殖が普及しない状況にある。近年では、いくつかの水処理装置が開発されているが、反応装置内の微生物群集が未知であり、除去メカニズムがブラックボックスに包まれている。従って、従来の方法では、有用微生物の有無や存在割合の把握が困難である。また、国内外で、塩分含有廃水や湖沼の富栄養化防止を目的とした研究が進んでいるが、いずれも高濃度の窒素成分を対象としており、低濃度の窒素成分除去に関して報告例は少ない。以上の理由により、高濃度微生物保持スポンジ担体技術と微生物固定化技術とを基盤とした、密閉型の海洋生物飼育水管理技術の開発への期待が高まっている。

これまでに、高濃度の塩分を含有する飼育水からアンモニア態窒素($\text{NH}_4^+\text{-N}$)及び、硝酸態窒素($\text{NO}_3^-\text{-N}$)を、それぞれ細菌を使って除去する方法が複数開発されている (Ruiz et al., 2019). 現状の飼育水処理装置 (特開 2000-126794 号公報, など) としては、水槽に硝化槽と脱窒槽を設け、それぞれに飼育水を循環させて、好気性の硝化槽は硝化細菌 (独立栄養細菌) により、アンモニア態窒素($\text{NH}_4^+\text{-N}$)及び、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 (硝化) させ、同時に嫌気性の脱窒槽内の脱窒細菌 (従属栄養細菌) により、亜硝酸態窒素($\text{NO}_2^-\text{-N}$)及び硝酸態窒素($\text{NO}_3^-\text{-N}$)を、窒素(N_2)に還元 (脱窒) する方法が知られている。しかしながら、水処理装置の処理能力低下を防ぐために、砂ろ過槽などの逆洗浄を行って、付着した有機物等を除去する必要がある。しかし、逆洗浄は汚濁水が発生させる原因となり、この汚濁水の処理コストが嵩むなど問題を有する (Badiola et al., 2012). さらに、現状では、脱窒処理装置の処理速度が低く、コンパクト化が図られておらず、敷施設費、装置費ともにコスト高となっている。現状では、飼育水槽容積に対して 1~3 割程度の容積となる大きな脱窒処理槽が必要である。

濱口らは、研究成果で得られている“塩分耐性微生物の高濃度保持による窒素含有廃水の高速処理技術装置のユニット化”のバックを行い、展示水槽等の小規模施設からよく食産業等の大規模施設の全てを網羅する技術を開発している (濱口ら 2010). この廃水技術の装置構成は、低濃度 (数十 mg/L) レベルの硝酸態窒素の処理 (硝酸態窒素を窒素ガスに変換) を対象とする生物学的脱窒装置を主とする (Watari et al., 2020). 硝

化（アンモニア態窒素等を硝酸態窒素に変換）が必要な場合には、従来法の砂ろ過を利用、もしくは独自技術である生物固定床型の下降流スポンジ懸架式装置（Down flow Hanging Sponge, DHS）を用いている（Adlin et al., 2018; Furukawa et al., 2016）。特に、本技術で微生物保持担体として利用されたスポンジは、95～99%が空隙であるため微生物を高濃度（数万 mg/L レベル）に保持できる（Hatamoto et al., 2018）。これは、競合品の担体を構成するポリエチレン PE、ポリスチレン PS が表面にしか微生物を保持できないことに比較して優れた点といえる。さらに、高塩分濃度においても耐塩性があり、低濃度まで窒素を処理可能な *Thauera* 属の脱窒菌を選択的に優先菌として保持・制御している。従来法と比較して、反応槽内に菌体乾燥濃度で 4 万 mg/L 程度の高濃度微生物を保持可能にしたことで、低濃度窒素含有廃水の高速処理（従来比 4～20 倍）が実現されている（濱口ら 2010）。

上述のように、塩耐性を有している硝酸態窒素除去微生物は、*Thauera* 属に有する微生物群である。従って、硝酸態窒素除去を行うためには、*Thauera* 属に有する微生物群が多く存在する微生物汚泥を創出することが極めて重要となる。先行研究では、数リットル規模の少量の有用微生物を、2-3 ヶ月間で、1 万倍レベルに増やすための培養のスケールアップ方法の検討が行われ、粒状微生物集塊（メタン発酵を行う粒状嫌気性微生物集塊、通称、グラニュール汚泥）と、食品工場の活性汚泥もしくは消化汚泥を植種汚泥が使用された（山口ら 未発表）。有用微生物の高速かつ大量培養装置の開発に際しては、単一の 1 m³ の培養装置（水棲生物水槽容量の 100 m³ を対象として約 1%の容量）を用いた有用微生物の微生物増殖実証実験が実施されており、窒素負荷 30 mg・L⁻¹・day⁻¹ の硝酸態窒素が除去されずに蓄積した場合の値を想定硝酸態窒素濃度としたとき、有用微生物の高速かつ大量培養装置内の硝酸態窒素除去率は、常に 80%以上であった。また、継続的に添加される硝酸態窒素の蓄積も見られず安定した水処理が可能になっており、この結果は、*Thauera* 属に属する硝酸態窒素除去微生物の高速（短期間）かつ大量培養の成功によるものだと考えられている。*Thauera* 属の微生物を高速かつ大量培養できた要因として、硝酸態窒素に対する基質親和性の高い電子供与体である酢酸を使用したことが挙げられている。さらに、上記の大量培養装置（培養装置容積 1 m³）をベースとして、いくつかの培養装置を連結させ、小規模水槽から大規模水槽まで対応可能な装置ユニットの実証実験が実施された。長岡科学技術大学山口研究室では、大量培養装置を 12 個連結させ（水棲生物水槽容量 1200 m³ に対応）、同時に窒素負荷 320 mg・L⁻¹・day⁻¹ としたうえで、12 個の大量培養装置による有用微生物の大量培養が可能な実験条件の最適化が行われた。12 個の大量培養装置の平均硝酸態窒素除去率は、全ての期間で 80%

以上を示しており、培養期間 90 日以降では 95% 以上であった。この結果から、大量培養装置内の硝酸態窒素除去微生物の増殖により常に高い硝酸態窒素除去性能を示すことが明らかになっている（山口ら 未発表）。

以上のように、微生物を用いた閉鎖循環式水処理技術は、海洋生物飼育・養殖のための水処理技術などの事業分野に有用で、維持管理作業の低減、設置面積削減、および消費される熱交換や運搬に関わるエネルギーを削減可能であり、市場に対するインパクトも大きい。養殖用の飼育水再生・水質管理の技術については、大陸内部や乾燥地地帯など国際的なニーズも高い。これら技術の波及効果を高めるためには、1 年間以上海洋生物飼育水交換を必要としない水質制御技術、本技術の装置設計、および有用浄化微生物の固定化・早期大量培養技術に関する知見の蓄積が重要な課題とされている。

2.4 藻類等を用いた窒素除去

近年、アンモニア除去技術のひとつとして、微細藻類と硝化菌の組み合わせが注目されている（Rada-Ariza, A. M. et al., 2017; Subashchandrabose, S. R. et al., 2011）。アンモニアの除去は、微細藻類と硝化細菌が共存するときに、微細藻類の活動と AOB や NOB による硝化反応によって起こる。このプロセスでは、微細藻類の光合成によって酸素が補われ、硝化反応で消費される。このように、微細藻類-硝化細菌プロセスは曝気を必要とせず、エネルギーの節約ができる（González-Fernández et al., 2013）。また、微細藻類を収穫し、バイオ燃料、肥料、動物や水生生物の飼料などの副産物を生産することができる（Akizuki et al., 2020; Rizwan et al., 2018）。微細藻類-硝化細菌プロセスの応用にはいくつかの課題があるが、それは、細菌と微細藻類の両方のプロセスを効率的に行うためのリアクターの設計が必要であるからである。したがって、バイオフィロック化、収穫、バイオマス制御を改善するために、操作条件の正確な仕様を調べなければならない。微細藻類-硝化細菌プロセスには、シーケンス型バッチ式フォト・バイオリアクターが広く用いられており（Rada-Ariza, A. M. et al., 2017; Wang et al., 2015）、明期と暗期を交互に繰り返すことができる。明期には、光合成酸素の発生が AOB を刺激する。暗期には、微生物の活動や藻類の呼吸によって DO が急速に消費され、脱窒が促進される（Wang et al., 2015）。シーケンス型バッチ式フォト・バイオリアクターでは、混合を除いて曝気を行わなくても、全窒素の 90% 以上を除去することができる（Wang et al., 2015）。汚泥滞留時間は、栄養塩除去プロセスとシーケンス型バッチ式フォト・バイオリアクターでの成長を制御するための重要な運転パラメータである（Rada-Ariza et al., 2019）。そのため、

新しいリアクター構成を開発することで、微細藻類細菌コンソーシアムの汚泥滞留時間を長くすることができる。

バッフル型リアクターの設計は 1980 年代初頭にさかのぼり、他のシステムに比べていくつかの利点を持つ (Barber and Stuckey, 1999)。これには、水圧や有機物による衝撃からの回復力、バイオマスの保持時間の長さ、汚泥の発生量の少なさ、好気性/嫌気性異化作用の様々な段階を部分的に分離する能力などが含まれる。嫌気性条件下で広く使われているバッフル型リアクターは、嫌気性バッフルド・リアクター (ABR) と呼ばれている。一般的な嫌気的生物処理では、前段で酸生成、後段でメタン発酵を行うが、それぞれで適した pH や微生物叢が異なる。ABR は、装置内を邪魔板で仕切ることで、処理段階に応じてこのような条件を整えられることを特徴としており、コンパクトで運転管理が簡易な手法の一つとして挙げられる (図 2-2)。ABR の最も大きな利点は、典型的なリアクター構成でアセトゲンとメタノゲンを縦方向に分離できることである。この 2 段階の運転により、最初の段階でアセトゲンが蓄積され、異なる微生物群が好ましい条件下で発生するため、アセトゲンとメタノゲンの活性が最大で 4 倍に向上する。そのため、ABR は様々な産業廃水の処理に使用されている (Nguyen et al., 2020; Putra et al., 2020)。このような利点があるにもかかわらず、微細藻類細菌コンソーシアムの窒素除去システムにバッフルド・リアクターを適用した報告はこれまでほとんどないのは、今のところ、その窒素除去性能評価が十分に検討されていないためと考えられる。

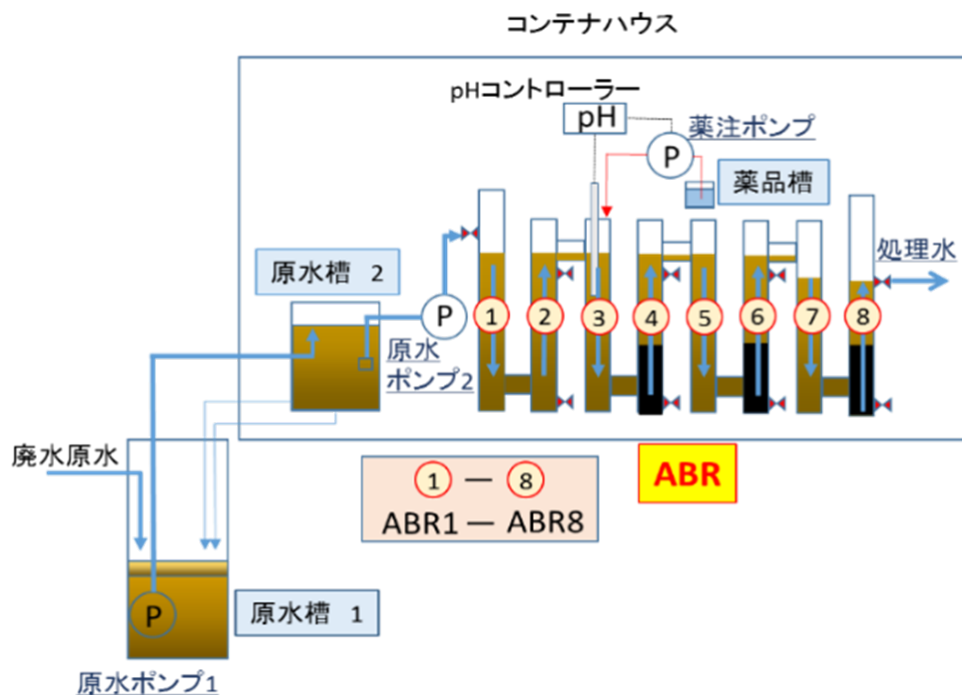


図 2-2. 嫌気性バッフルドリアクター (ABR) の構成

2.5 小括

本章にまとめた既往の研究から、閉鎖循環式の飼育水管理技術に関して、次の点が課題として挙げられたため、次章以降では実験的検証を含めた検討をおこなった。

- ・ DHS-USB システムを用いた閉鎖循環型陸上養殖システムの開発（第3章）
- ・ 微細藻類-細菌共生系プロセスとバッフルドリアクターによる新規窒素除去システムの開発（第4章）

参考文献

- Adlin, N., Matsuura, N., Ohta, Y., Hirakata, Y., Maki, S., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., 2018. A nitrogen removal system to limit water exchange for recirculating freshwater aquarium using DHS-USB reactor. *Environ. Technol.* 39, 1577–1585.
- Ahn, Y. H., 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*. 41, 1709-1721.
- Akizuki, S., Kishi, M., Cuevas-Rodríguez, G., Toda, T., 2020. Effects of different light conditions on ammonium removal in a consortium of microalgae and partial nitrifying granules. *Water Res.* 171.
- Barber, W.P., Stuckey, D.C., 1999. The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: a review. *Water Res.* 33, 1559–1578.
- Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J., 2012. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquac. Eng.* 51, 26–35.
- Cristina González-Fernández, Mercedes Ballesteros., 2013. Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods. *Journal of Applied Phycology*. 25, 991-999.
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture

2020. In brief, The United Nations. Retrieved from <http://www.fao.org/publications/card/en/c/CA9231EN>

Furukawa, A., Matsuura, N., Mori, M., Kawamata, M., Kusaka, J., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., 2016. Development of a DHS-USB recirculating system to remove nitrogen from a marine fish aquarium. *Aquac. Eng.* 74, 174–179.

濱口威真, 高橋優信, 川上周司, 山口隆司, 荒木信夫, 森正人, 川又睦, 帆秋利洋 海水魚飼育水からの生物学的脱窒処理, 日本水環境学会シンポジウム, pp.140-140, 2010

González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2013. Microalgae autoflocculation: An alternative to high-energy consuming harvesting methods. *Journal of Applied Phycology* 25, pages 991–999

Hatamoto, M., Okubo, T., Kubota, K., Yamaguchi, T., 2018. Characterization of downflow hanging sponge reactors with regard to structure, process function, and microbial community compositions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 10345–10352.

Kim, S. H., Kim, J. H., Park, M. A., Hwang, S. D., Kang, J. C., 2015. The toxic effects of ammonia exposure on antioxidant and immune responses in Rockfish, *Sebastes schlegelii* during thermal stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 40, 954-959.

Lemarié, G., Dosdat, A., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E., Person-Le Ruyet, J., 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture.* 229, 479–491.

Neto, I.A., Brandão, H., Furtado, P.S., Wasielesky, W., 2019. Acute toxicity of nitrate in *Litopenaeus vannamei* juveniles at low salinity levels. *Cienc. Rural* 49, 1–9.

Nguyen, T.H., Watari, T., Hatamoto, M., Sutani, D., Setiadi, T., Yamaguchi, T., 2020. Evaluation of a combined anaerobic baffled reactor–downflow hanging sponge biosystem for treatment of synthetic dyeing wastewater. *Environ. Technol. Innov.* 19, 100913.

Putra, A.A., Watari, T., Hatamoto, M., Konda, T., Matsuzaki, K., Kurniawan, T.H., Yamaguchi, T., 2020. Performance of real-scale anaerobic baffled reactor-swim bed tank system in treating fishmeal wastewater. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 55, 1415–1423.

Rada-Ariza, A.M., Fredy, D., Lopez-Vazquez, C.M., Van der Steen, N.P., Lens, P.N.L., 2019. Ammonium removal mechanisms in a microalgal-bacterial sequencing-batch photobioreactor at different solids retention times. *Algal Res.* 39, 101468.

Rada-Ariza, A. M., Lopez-Vazquez, C. M., Van der Steen, N. P., Lens, P. N. L., 2017. Nitrification by microalgal-bacterial consortia for ammonium removal in flat panel sequencing batch photobioreactors. *Bioresource Technology.* 245, 81-89.

Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S.A., Lee, K., Rashid, N., 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 92, 394–404.

Ruiz, P., Vidal, J.M., Sepúlveda, D., Torres, C., Villouta, G., Carrasco, C., Aguilera, F., Ruiz-Tagle, N., Urrutia, H., 2019. Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *Rev. Aquac.* 1–17.

Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2011. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances.* 29, 896-907.

Wang, M., Yang, H., Ergas, S.J., van der Steen, P., 2015. A novel shortcut nitrogen removal process using an algal-bacterial consortium in a photo-sequencing batch reactor (PSBR). *Water Res.* 87, 38–48.

Watari, T., Kotcharoen, W., Omine, T., Hatamoto, M., Araki, N., Oshiki, M., Mimura, K., Nagano, A., Yamaguchi, T., 2020. Formation of denitrifying granules in an upflow sludge blanket reactor

with municipal sewage and sodium nitrate feeding. Environ. Technol. Innov. 19, 100861.

第3章 DHS-USB システムを用いた閉鎖循環型陸上養殖システムの開発

3.1 はじめに

日本では「クエ」などの名で知られている *Epinephelus bruneus* は、南日本からフィリピンにかけて分布する熱帯魚である (Yoshii et al., 2010). このクエは2~3年で市場に出せる大きさに成長し、日本では1 kg あたり約40ドルの高値で取引されている。そのため、*E. bruneus* の養殖は日本でも広く研究されている (Kuriyama, 2008; Yoshii et al., 2010). Kuriyama (2008) は *E. bruneus* を 閉鎖循環型陸上養殖システム で養殖し、26°Cの温度管理下で高い成長率を達成したことを報告している。

本研究では、パイロットスケールの *E. bruneus* 用閉鎖循環型陸上養殖システムにおける水浄化システムとして DHS-USB システムを用い、TAN, 亜硝酸, 硝酸を測定することで、266 日間にわたる魚の生存率と窒素除去性能を評価した。さらに、硝化・脱窒に関わる微生物に対する理解を深めるため、DHS リアクターと USB リアクターに存在する微生物群集の特徴付けも行った。

3.2 実験方法

3.2.1 実験装置と操作方法

図 3-1 (A) は、本研究で使用した密閉型閉鎖循環型陸上養殖システムの概略図である。本システムは長岡技術科学大学(新潟県長岡市)に設置し、評価も同大学で行った。本システムは水槽にも適用されているが、水産養殖には初の試みである (Adlin et al., 2017). 温度調節した養殖用の水槽施設の水量は 5,000 L, 水深は 1.0 m であった。人工海水は、合成海水塩(マリンアート, 富田製薬, 日本)を用いて調製した。1 週間ごとに水道水を加えることによって養殖水槽の塩分濃度を 30-35‰ に調整した。DHS リアクター2 基と USB リアクター2 基を養殖水槽に設置し、閉鎖循環型陸上養殖システムの水維持システムとして稼働させた。DHS-USB システムの運転条件を表 3-1 にまとめた。DHS リアクターは、直径 600 mm, 高さ 1.3 m の大きさで水の分配装置も備えていた。バイオマス保持型担体としては、直径 33 mm, 長さ 33 mm の円柱状のプラスチックネットリングの中に立方体のスポンジ (33 mm×33 mm×33 mm) を詰めたものを使用した (図 3-1 (B)). スポンジ担体の孔径は 0.46 mm, 空隙率は 0.98 であった。スポンジ担体の比表面積は $1.87 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$ であった (Onodera et al., 2016). 各 DHS リアクターの総容積は 400 L, スポンジの体積は 200 L であった。DHS リアクター2 は硝化を促進し、132 日目以降は溶存酸素 (DO) を供給するために設置した。DHS リアクターの水理的

滞留時間 (HRT: Hydraulic retention time) は、スポンジの体積に基づいて算出した。DHS リアクター1と DHS リアクター2 の濾過量と有効表面積はそれぞれ $390 \text{ L} \cdot \text{L-sponge}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ と $780 \text{ L} \cdot \text{L-sponge}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$, $208 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^2\text{-sponge surface area} \cdot \text{day}^{-1}$ と $420 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^2\text{-sponge surface area} \cdot \text{day}^{-1}$ であった。閉鎖循環型陸上養殖システム内の養殖用水は、遠心ポンプを用いて DHS リアクターの上部に供給し、1 時間に 1 回、すべての養殖用水を DHS リアクター内に移動させた。処理水を殺菌するために、UV ランプ (UVF-1000, REI-SEA, 日本) を DHS リアクター1 の出口に取り付けた。USB リアクターは、直径 200mm, 高さ 1.5 m の透明な PVC パイプで構成されていた。別の USB リアクターで得られた嫌気性/無酸素性の脱窒粒状汚泥 20 L を、種汚泥として両方の USB リアクターに接種した。各 USB リアクターでは、1 日に総養殖用水量の 10% を処理し、USB 排水は DHS リアクターに供給して亜硝酸を酸化させた。酢酸ナトリウムは、嫌気性/貧酸素性脱窒の電子供与体として、定量ポンプを用いて USB リアクターに供給された。酢酸ナトリウムの補給量は、以下の式を用いて算出した。

$$S = N \times C/N \text{ 比} + D \times C/O \text{ 比} \quad \dots\dots\dots (3-1)$$

C/N 比 : 1.2, C/O 比 : 0.375 の場合

S : サプリメントの酢酸ナトリウム濃度 ($\text{mg} \cdot \text{C} \cdot \text{L}^{-1}$)

N : USB 流入硝酸濃度 ($\text{mg} \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$)

D : USB 流入 DO 濃度 ($\text{mg} \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$)

表 3-1. DHS – USB システムの運転条件

Phase	DHS 1		DHS 2		USB 1		USB 2	
	Flow rate (L·hour ⁻¹)	HRT (mins)	Flow rate (L·hour ⁻¹)	HRT (mins)	Flow rate (L·hour ⁻¹)	HRT (hours)	Flow rate (L·hour ⁻¹)	HRT (hours)
Phase 1 (days 1 to 132)	6,500 ~ 9,800	1.22 ~ 1.85	-	-	300 ~ 400	1.9 ~ 3.2	300 ~ 400	1.9 ~ 3.2
Phase 2 (days 132 to 137)	6,500	1.85	6,500	1.85	300 ~ 400	1.9 ~ 3.2	300 ~ 400	1.9 ~ 3.2
Phase 3 (days 138 to 224)	6,500	1.85	6,500	1.85	500	1.9	500	1.9

-: Not operated

DHS: down-flow hanging sponge, USB: upflow sludge blanket, HRT: hydraulic retention time.

3.2.2 *E. bruneus* の飼育条件

E. bruneus は、1 日目から 150 日目までの間に 305 尾（平均初期体長 15.5 cm）を本 閉鎖循環型陸上養殖システム で初期養殖した。本研究の初期における閉鎖循環型陸上養殖システムの魚体密度は約 4.0 kg-fish·m⁻³ であった。151 日目に *E. bruneus* の数を 196 匹に減らして魚体密度を下げた。本研究では、*E. bruneus* の養殖において、「Kuetaro P-1（ヒガシマル）」、「Whitefloat 4（マルハニチロ）」、「Whitefloat 6（マルハニチロ）」の 3 種類の人工飼料を用意し、魚の成長に合わせて与えた。「Kuetaro P-1（ヒガシマル）」、「Whitefloat 4（マルハニチロ）」、「Whitefloat 6（マルハニチロ）」に含まれるタンパク質の割合は、それぞれ 50%以上、52%以上、57%以上であった。人工飼料の給餌率は、*E. bruneus* の総重量の 1%/日であった。

E. bruneus の体長と体重の測定は、約 10 日ごとに無作為に 20 匹を捕獲し、2-フェノキシエタノール 200 ppm による麻酔をかけて行った。

3.2.3 水質分析

水試料は、養殖水槽、USB 処理水、DHS 処理水から採取した。pH は pH メーター（HM-30R, 東亜ディーケーケー, 東京都新宿区）を用いて測定した。養殖水槽の水温と DO は DO メーター（HQ30d, HACH, 米国コロラド州ラブランド）を用いて現場で測定した。酸素還元電位（ORP）は ORP メーター（RM-30P, 東亜ディーケーケー, 東京）を用いて測定した。養殖水槽の塩分濃度は海水濃度屈折計（MASTER-S/Milla, アタゴ, 東京）を用いて測定した。TAN は多重水質計（DR-2800, HACH, 米国コロラド州ラブランド）を用いて分析した。硝酸塩と亜硝酸塩は、0.25μm のメンブレンフィルタ

ーで濾過した後、高速イオンクロマトグラフ (LC-20AT, 島津製作所, 京都) で測定した。保持汚泥濃度を分析するため、DHS リアクター1 の下部, 中部, 上部からスポンジ担体を回収した。DHS 保持汚泥の混合液性懸濁物質 (MLSS: Mixed liquor suspended solids) および混合液性揮発性懸濁物質 (MLVSS: Mixed liquor volatile suspended solid) は、米国公衆衛生協会による「水と排水の検査規格」 (APHA, 2005)を用いて測定した。養殖水槽内で予想される窒素負荷率は以下の式で算出した。

$$\text{NLR} = F \times 28.4 \text{ (mg-N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{feed}^{-1}) \times 75\% \text{ ----- (3-2)}$$

NLR: 予想される窒素負荷率: (mg-N·day⁻¹)

F: 給餌量 (g·day⁻¹)

75%: 魚が排泄する代謝老廃物に由来する溶存窒素の割合の期待値 (Hlaváč et al., 2014; Leung et al., 1999; Rychly, 1980)

3.2.4 16S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物解析

143 日目と 224 日目に、DHS リアクター2 基と USB リアクター2 基から、DHS 保持汚泥と USB 保持汚泥の試料を 8 つずつ採取した。微生物群集分析のためのスポンジ担体は DHS リアクターの中央部から採取した。USB リアクターの滞留汚泥試料はリアクターの底部から採取した。DHS スポンジの保持汚泥は、純水を用いて軽く絞った。得られたスラッジの試料はリン緩衝生理食塩水で洗浄し、-20℃で保存した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、長岡技術科学大学で、我々が以前に行った研究と同じ手順で実施した (Satanwat et al., 2020)。DNA 抽出は、土壤用 FastDNA スピンキット (MP バイオメディカルズ, 東京) を用いて行い、抽出した DNA 濃度は、Qubit dsDNA BR アッセイキットと Qubit 3.0 分光蛍光光度計 (Thermo Fisher Scientific, 米国マサチューセッツ州ウォルサム) を用いて測定した。16S rRNA 遺伝子の V3-4 領域のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅は、すべての細菌および古細菌用のユニバーサルフォワードプライマー Univ515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTAA-3') とユニバーサルリバースプライマー Univ806R (5'-GGACTACHV GGG TWT CTAAT-3') を用いて行った (Caporaso et al., 2012)。PCR 増幅用混合液の容量は 20 μL で抽出した DNA 20 ng, 各プライマー (各 0.5 μM), ホットスタート用 Premix Ex Taq (1 U μL⁻¹, タカラバイオ, 滋賀県草津市) を含んでいた。PCR 産物の精製は、QIAquick PCR 精製キット (Qiagen, オランダ・フェンロー) を用いて行った。MiSeq 試薬キット v.2 と MiSeq システム (Illumina, 米国カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて、大規模な並列型 16S rRNA 遺伝子シーケンシングを行っ

た。配列データは、QIIME ソフトウェアパッケージ v.1.9.1 を用いて解析した (Caporaso et al., 2010)。低品質 (<Q30) の生配列リードのトリミングとフィルタリングは、ペア エンドアセンブラを用いてアセンブルする前に Trimmomatic 0.33 によって行った。97% の配列同一性基準を用いて作業的分類単位 (OTU) を分類した。Chime layer (Haas et al., 2011) を用いてキメラ配列を検出・除去した。OTU の分類は、Greengenes Database v.13_8 を用いて行った。それぞれの配列の同一性は、NCBI データベースのウェブベースの BLAST 検索を用いて決定した (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)。アルファ多様性指数 (Shannon, Coverage, Chao 1) は、QIIME ソフトウェアパッケージ v.1.9.1 (Caporaso et al., 2010)を用いてリード数 6,979 のサンプル深度で算出した。析項目は水温、pH、DO、TSS、VSS、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ とした。水温、pH、DO は供試廃水タンク、各槽 (水面付近)、処理水で測定した。採水箇所は TSS、VSS では処理水、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ では供試廃水タンク、処理水とした。

pH はポータブル pH メーター (D-52, HORIBA 社)、水温と DO はポータブル DO メーター (HQ30d, HACH 社) を用いて測定した。

TSS、VSS の測定方法は下水試験方法のガラス繊維ろ紙法とした。使用したガラス繊維ろ紙は GF/B (粒子保持能 1.0 μm , Whatman 社) とした。

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ の測定方法はネスラー法とし、吸光光度方式水質測定器 (DR-2800, HACH 社) を用いて測定した。 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ と $\text{NO}_3^-\text{-N}$ は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した (High Performance Liquid Chromatography: HPLC, SHIMADZU)。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ を測定する前に、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は 0.45 μm 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ と $\text{NO}_3^-\text{-N}$ は 0.22 μm のフィルターを用いてろ過した。

3.3 実験結果および考察

3.3.1 養殖水槽の水質

DHS-USB システムは、閉鎖循環型陸上養殖システム内の水質を維持するために 200 日以上にわたって運転した。図 3-2 は、実験期間中の養殖水槽の水質パラメータを示したものである。試験期間中、水質の悪化による魚の死亡はなかった。酢酸ナトリウムを USB リアクターの炭素源とした脱窒工程により pH が上昇したため、養殖水槽内の pH は 8.0 ± 0.2 と安定していた。養殖魚は pH の変化に非常に敏感であるため、養殖水槽内では pH の静的な調整が必要であった (Badiola et al., 2012)。硝酸ナトリウムを供給する閉鎖循環型陸上養殖システムリアクターと USB リアクターの組み合わせは、脱窒と pH 調整の両方を行うことができる適切な組み合わせであった。

閉鎖循環型陸上養殖システム水槽の DO 濃度を図 3-2 (B) に示した。DO は魚類にとって不可欠なものであり、従来のシステムでは曝気装置に大量の電力供給を要する。一般的に、魚類が生存するためには DO を $6.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上に保つ必要がある。これまでの研究では、曝気に必要なエネルギーは、小規模閉鎖循環型陸上養殖システムの全エネルギー消費量の約 20% であることが報告されている (d'orbcastel et al., 2009)。DHS リアクターは、外部から曝気しなくても、スポンジバイオマスを保持した担体を介して養殖用水に DO を供給することができる。実験期間中の養殖水槽の DO 濃度は $6.4 \pm 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ に保たれた。Uemura et al. (2016) は、DHS リアクターが他の機械的な曝気工程よりも高い酸素移動速度を達成していることを報告した。したがって、DHS リアクターを介した酸素補給は、曝気のない閉鎖循環型陸上養殖システムに適していると考えられる。

養殖水槽内の TAN は、実験期間全体を通じて $0.33 \pm 0.12 \text{ mg} \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ の低濃度に保たれていた (図 3-2)。これまでの研究では、TAN 濃度は $1.0 \text{ mg} \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下に抑制する必要があるとされていた (De Lourdes Cobo et al., 2014)。実験期間全体で、先行研究と比較して低い濃度を維持していた (Díaz et al., 2012)。亜硝酸塩と硝酸塩の蓄積は、給餌量と魚の体重が増加したことにより、60~80 日目と 100~132 日目に観察された (例：117 日目に $0.49 \text{ mg} \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$)。図 3-5 に魚の成長率を示す。結果として、DHS リアクターの窒素負荷率が上昇した。そこで、132 日目に 2 基目の DHS リアクターを設置した。2 基目の DHS リアクターを設置した後は亜硝酸塩のさらなる蓄積は観察されなかった。実験期間中の養殖水槽の硝酸濃度は $26.2 \pm 12.5 \text{ mg} \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ であった。閉鎖循環型陸上養殖システムにおける硝酸塩の蓄積は魚の成長を阻害する可能性があり、 $60 \text{ mg} \cdot \text{N} \cdot \text{day}^{-1}$ 以下で管理することが推奨されている (Neto et al., 2019)。硝酸塩濃度が最も高かったのは Phase 2 であったが、これは基質の供給ラインが詰まり、基質が USB リアクターに供給されなくなったためである。Kuriyama (2008) は、*E. bruneus* が最大 $475.8 \text{ mg} \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ の硝酸塩濃度に耐えられると報告している。したがって、DHS-USB システムを用いることで養殖水槽の水質を適切に保つことができた。

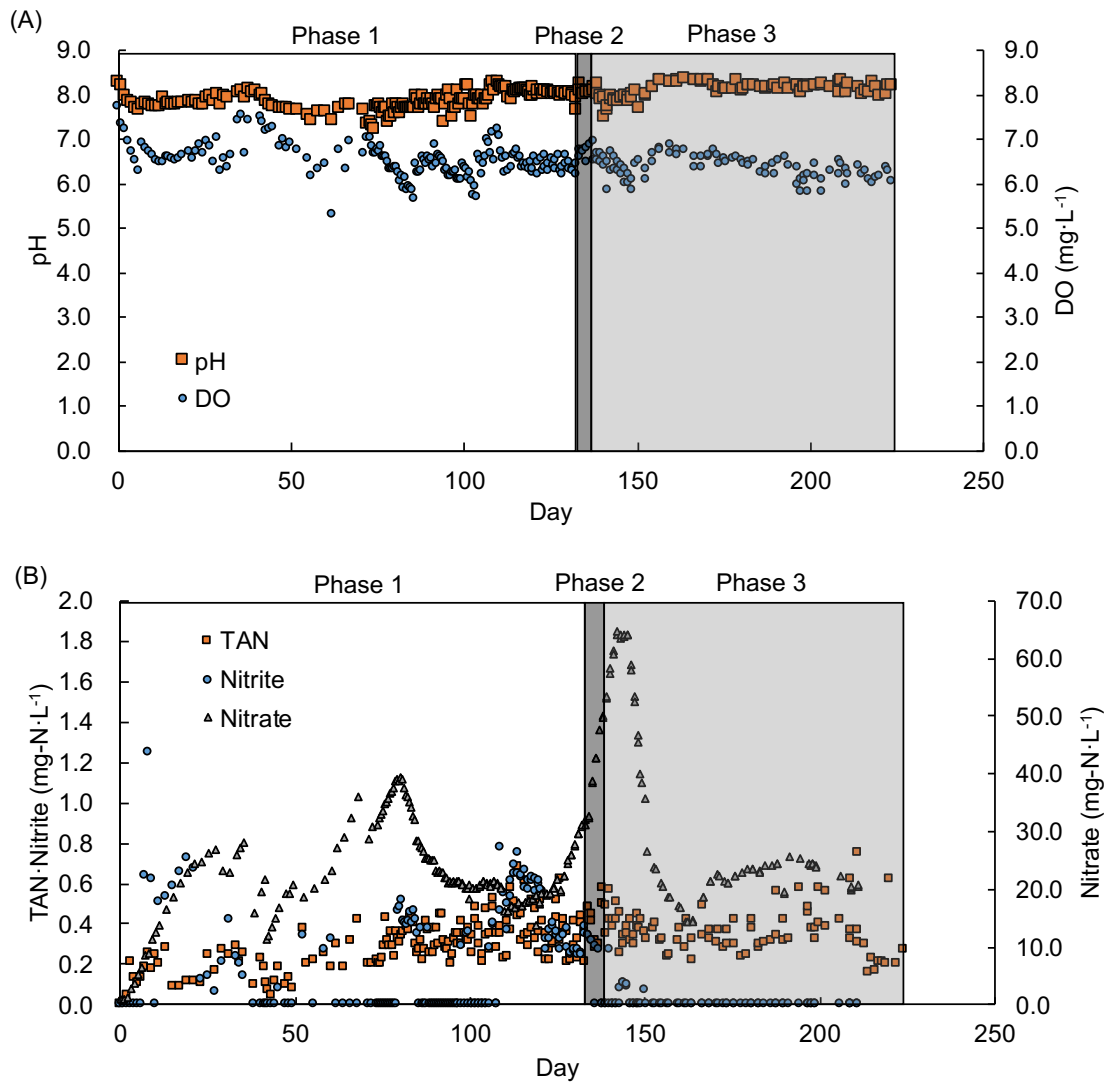


図 3-2 養殖水槽内の(A) pH 及び DO (B) TAN, 亜硝酸, 硝酸濃度

3.3.2 DHS-USB システムの処理性能

表 2 は, 実験期間中の DHS-USB システムの水質を示している. 飼料投入量に基づいて計算した養殖水槽内の予想窒素負荷率は, Phase 1 から Phase 3 にかけてそれぞれ $8.32 \pm 3.11 \text{ g-N} \cdot \text{day}^{-1}$, $5.99 \pm 6.40 \text{ g-N} \cdot \text{day}^{-1}$, $6.45 \pm 4.50 \text{ g-N} \cdot \text{day}^{-1}$ であった. DHS リアクターは 1.22 分から 1.85 分までの短い HRT で水産養殖排水の効果的な硝化を行い, Phase 1 と Phase 3 における DHS 排水の硝酸濃度はそれぞれ $15.4 \pm 7.7 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ と $23.3 \pm 1.8 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ であった. DHS リアクターのこの高い硝化活性は, スポンジ担体における高いバイオマス保持率を促進させ, 高流量条件への適応を可能にしていると考えられる. DHS のスポンジ担体は, 229 日目に $10.6 \pm 0.4 \text{ mg-MLSS} \cdot \text{L-sponge}^{-1}$ と $4.0 \pm 0.2 \text{ mg-MLSS} \cdot \text{L-sponge}^{-1}$

sponge⁻¹を保持した。この保持されたバイオマス濃度は、HRT が長い他の DHS リアクターによって処理された水産養殖排水で観察されたものと同じであった (Homchoam and Yoochatchaval, 2019)。さらに、一部の TAN が DHS リアクター内で揮発した可能性がある (Liu et al., 2019)。実験期間中、DHS リアクターが詰まる事象は観察されなかった。本研究の間、DHS リアクターのスポンジ担体を置換することはなかった。したがって、DHS リアクターは、簡単な操作で低い TAN 濃度を維持することに成功した。

養殖用水の脱窒のために USB リアクターを 2 基設置した。USB リアクター1 はすぐにスタートアップが完了し、31 日目には硝酸塩除去率 100% (USB 1 流出液の硝酸塩濃度は $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) に達した。USB リアクター1 と USB リアクター2 はともに、Phase 1 ではそれぞれ $98.3\pm 7.6\%$ と $89.7\pm 22.9\%$ という高い硝酸塩除去効率を示した。Phase 2 では、ポンプのトラブルにより USB リアクターの硝酸塩除去効率が低下し、基質の供給が停止された。この Phase では、USB リアクター1 において主に TAN と亜硝酸が生成されていた。しかし、DHS リアクターに通すことで、養殖水槽の TAN 濃度を $0.4 \pm 0.1 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ に保つことができた。Phase 3 では、USB リアクターは十分な硝酸塩除去を行い、USB リアクター1 と USB リアクター2 の排水の硝酸塩濃度はそれぞれ $3.7 \pm 5.6 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ と $2.1 \pm 5.7 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。全運転期間を通して、USB リアクター1 と USB リアクターは、それぞれ $84\pm 24 \%$ と $91\pm 21 \%$ の硝酸塩除去効率を達成した。これらの結果から、DHS-USB リアクターは、閉鎖循環型陸上養殖システムの水質維持システムに適したシステムである可能性が示された。

表 3-2 UASB-DHS システムの水質

	pH	ORP mV	DO mgL ⁻¹	TAN mg-NL ⁻¹	Nitrite mg-NL ⁻¹	Nitrate mg-NL ⁻¹
Phase 1 (day1 ~ day132)						
Tank (USB and DHS inf.)	7.9 ± 0.2	78 ± 40	6.5 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.3	22.6 ± 7.9
USB 1 eff.	8.1 ± 0.4	-265 ± 58	0.9 ± 0.5	2.5 ± 2.1	0.0 ± 0.0	0.3 ± 1.8
USB 2 eff.	8.1 ± 0.2	-167 ± 87	1.0 ± 0.5	1.1 ± 1.1	0.5 ± 1.5	2.2 ± 5.3
DHS 1 eff.	7.9 ± 0.2	60 ± 23	6.8 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2	15.4 ± 7.7
Phase 2 (day 132-145)						
Tank (USB and DHS inf.)	8.0 ± 0.2	77 ± 35	6.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	53.8 ± 10.8
USB 1 eff.	7.6 ± 0.2	1.4 ± 132	1.8 ± 0.4	4.4 ± 8.3	9.3 ± 12.8	36.1 ± 20.5
USB 2 eff.	7.8 ± 0.4	25 ± 77	2.1 ± 0.4	2.7 ± 3.7	0.4 ± 0.3	38 ± 18
DHS 1 eff.	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Phase 3 (day146 ~ 224)						
Tank (USB and DHS inf.)	8.2 ± 0.1	68 ± 21	6.4 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.0 ± 0.0	25.0 ± 9.5
USB 1 eff.	8.2 ± 0.1	-191 ± 113	1.4 ± 0.7	2.2 ± 1.5	0.1 ± 0.2	3.7 ± 5.6
USB 2 eff.	8.2 ± 0.1	-227 ± 102	1.5 ± 0.7	2.4 ± 1.3	0.0 ± 0.0	2.1 ± 5.7
DHS 1 eff.	8.1 ± 0.1	55 ± 24	6.1 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	23.3 ± 1.8

pH potential of hydrogen, ORP oxidation reduction potential, DO dissolved oxygen, TAN total ammonium nitrogen, USB upflow sludge blanket, DHS down-flow hanging sponge, ND not determined.

3.3.3 DHS リアクターの微生物群集構造

図 3-4 に運転 200 日目の各槽の (a) $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, (b) VSS, (c) Chlorophyll-a の水質プロファイル結果と図 3-5 に運転 365 日目の各槽の (a) $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, (b) VSS, (c) Chlorophyll-a の水質プロファイル結果を示す。149 日目と 224 日目に、16S rRNA 遺伝子ベースの塩基配列解析を用いて、DHS 保持汚泥の微生物群集構造を調べた (表 3-3)。149 日目と 224 日目の間、あるいは 2 つの DHS リアクターの間で、細菌または細菌-好気性菌の多様性に有意な差はなかった。DHS 保持汚泥中の主要な微生物グループは、*Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* の各門であった。これらの門群は、DHS リアクターで生活排水やその他の産業排水を処理する際に頻繁によく見られた (Hatamoto et al., 2018; Kubota et al., 2014; Mac Conell et al., 2015; Watari et al., 2017)。 *Proteobacteria* 門のメンバーの相対的な頻度は、すべての DHS 保持汚泥で 35% 以上であった。Phylum *Proteobacteria* は、窒素循環、特に硝化において重要な微生物を構成しており、アンモニア酸化細菌の機能群はこの門に属している (Purkhold et al., 2000)。嫌気性アンモニア酸化 (anammox) 過程に関連する Phylum *Planctomycetes* は、DHS を保持した汚泥で 2 番目に優勢であった。

表 3-3 (A) は、149 日目と 224 日目の DHS 保持汚泥中の支配的な硝化細菌を示している。DHS リアクター1 と DHS リアクター2 の間で硝化細菌の相対存在量が異なるのは、USB リアクターから DHS リアクター1 に亜硝酸を含む流出水が流入したためであると考えられる。海水の好気性アンモニア酸化古細菌を代表する *Nitrosopumilus* sp. が最も優占しており、相対存在量は 0.3%~2.2% であった (Qin et al., 2017)。この好気性アンモニア酸化古細菌は、水産養殖排水を処理するバイオフィルターにおける重要な硝化細菌である可能性がある (Huang et al., 2018)。さらに、アンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子は、アンモニア濃度が低い状態で観察された (Limpiyakorn et al., 2011)。亜硝酸酸化細菌の *Nitrospira* sp. の相対存在量は全配列リードのうち 0.5~1.8% であり、149 日目の DHS リアクター1 で最も高い頻度を示した。この時点では、USB リアクター1 の稼働トラブルにより、高濃度の亜硝酸が存在していた ($9.3 \pm 12.9 \text{ mg-N}\cdot\text{L}^{-1}$)。

DHS リアクターではいくつかの脱窒菌が検出された。*Halomonas* sp. は様々な炭素源で亜硝酸塩と硝酸塩を還元し (Kim et al., 2007)、DHS 滞留汚泥中の検出率は 0.1-0.5% であった。DHS リアクターで観察された脱窒反応は、スポンジ担体の複雑な酸素条件の変化によってできる嫌気状態によるものであった (Watari et al., 2017)。Araki et al. (1999)

は、DHS スポンジ担体の内部には無酸素/好気性ゾーンがあり、脱窒が発生した可能性のあることを報告している。本研究では、DHS リアクターは非常に高い流量で稼働したが、それでも脱窒が発生した無酸素/嫌気性ゾーンを有していた可能性がある。

DHS 保持汚泥のうち、いくつかの OTU がアナモックス様細菌に関連していた（図 3-3 (B)）。しかし、ほとんどの OTU は類似性が低く、窒素循環におけるアナモックス様細菌の役割は不明である。以前の研究では、生物学的フィルターでアナモックス活性が観察され、アナモックス細菌が完全な窒素除去のための重要な経路であることが報告されている（Tal et al., 2006）。したがって、この DHS リアクターでは、アナモックス細菌が窒素除去の役割を果たしていた可能性がある。

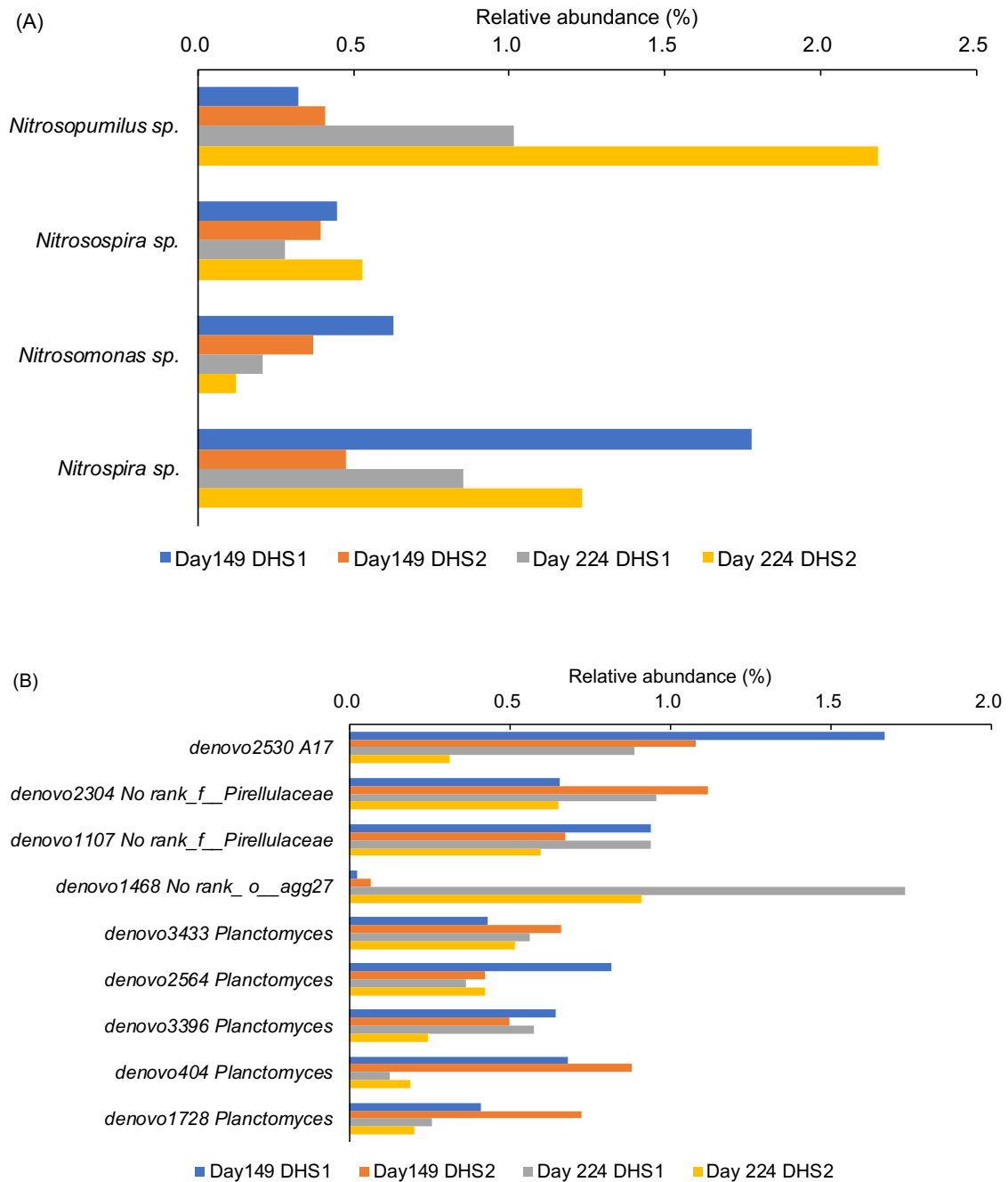


図 3-3 DHS リアクター内の(A) 硝化細菌 と(B) Anammox 細菌の検出率

表 3-3 DHS 保持汚泥内の微生物多用性と群集構造

	Day 149		Day 224	
	DHS1	DHS2	DHS1	DHS2
No. of sequences	8,085	7,596	10,447	7,367
No. of OTUs	1,055	988	1,050	952
Coverage	0.94	0.93	0.95	0.93
Shannon diversity	8.46	8.19	7.73	7.69
Chao 1 diversity	1,882	950	2,021	2,048
Phylogenetic affiliation	% of total sequence			
<i>Proteobacteria</i>	42.4	43.2	36.9	35.8
<i>Planctomycetes</i>	19.0	18.3	15.4	12.4
<i>Bacteroidetes</i>	4.6	11.8	19.2	23.1
<i>Actinobacteria</i>	8.6	6.6	8.1	9.0
<i>Chloroflexi</i>	5.9	7.2	9.2	4.6
<i>Verrucomicrobia</i>	1.2	1.8	3.1	5.7
<i>Chlamydiae</i>	3.6	2.9	0.9	0.7
<i>Gemmatimonadetes</i>	2.0	1.7	1.4	1.8
<i>Firmicutes</i>	3.7	0.6	0.3	0.3
<i>Nitrospirae</i>	1.8	0.5	0.9	1.3
<i>Others</i>	7.2	5.4	4.6	5.3

DHS: down-flow hanging sponge, OUT: operational taxonomic units

3.3.4 USB リアクターの微生物群集構造

USB リアクターにおいて優占した微生物門は *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota* であり、相対存在量はそれぞれ 56.9~70.2%, 2.7~12.9%, 13.0~16.2%であった。これらの微生物群は、海水魚の水槽に設置された別の USB リアクターにおいても確認された (Furukawa et al., 2016)。

149 日目と 229 日目の USB リアクターでは、7 属の脱窒菌が検出された (図 3-4)。最も優占していた脱窒菌は厳密な嫌気性細菌として知られている *Sedimenticola* sp. で、その相対存在量は 9.6~22.5%であった。13.5~26.9%の *Sedimenticola* sp. が、海水の水槽で

稼働している USB リアクターで検出された (Furukawa et al., 2016). Narasingarao and Häggblom (2006) は, *Sedimenticola* sp. が酢酸を利用できることを報告している (Narasingarao and Häggblom, 2006). さらに, *Sedimenticola* sp. は, 塩分を含む海産物の養殖からの排水を処理するスポンジ膜バイオリアクターでも発見された (Song et al., 2020). 酢酸ナトリウムは脱窒の炭素源として使用されていたため, USB リアクターでは *Sedimenticola* sp. が優勢である可能性がある. 中程度の好塩性の脱窒菌である *Halomonas* sp. は, USB 保持汚泥中で 2 番目に優占しており, その相対存在量は 7.0~14.4% であった (González-Domenech et al., 2009).

古細菌では, 水素酸化性の *Methanobacterium* sp. が頻繁に検出され, USB リアクターにおける相対存在量は 6.7~13.5% であった. 過去の研究では, *Methanobacterium* sp. は高塩分環境から分離され, H_2/O_2 でのみ増殖することが報告されている (Mori and Harayama, 2011). さらに, USB リアクターでは, プロピオン酸酸化細菌である *Syntrophobacter* sp. も検出された. USB リアクターによって生成されたガスにはある程度の濃度のメタンが含まれていた (データは非表示). そのため, USB リアクターでは, 塩分を含む環境下で脂肪酸酸化細菌と水素酸化性古細菌の共培養が行われていた可能性がある.

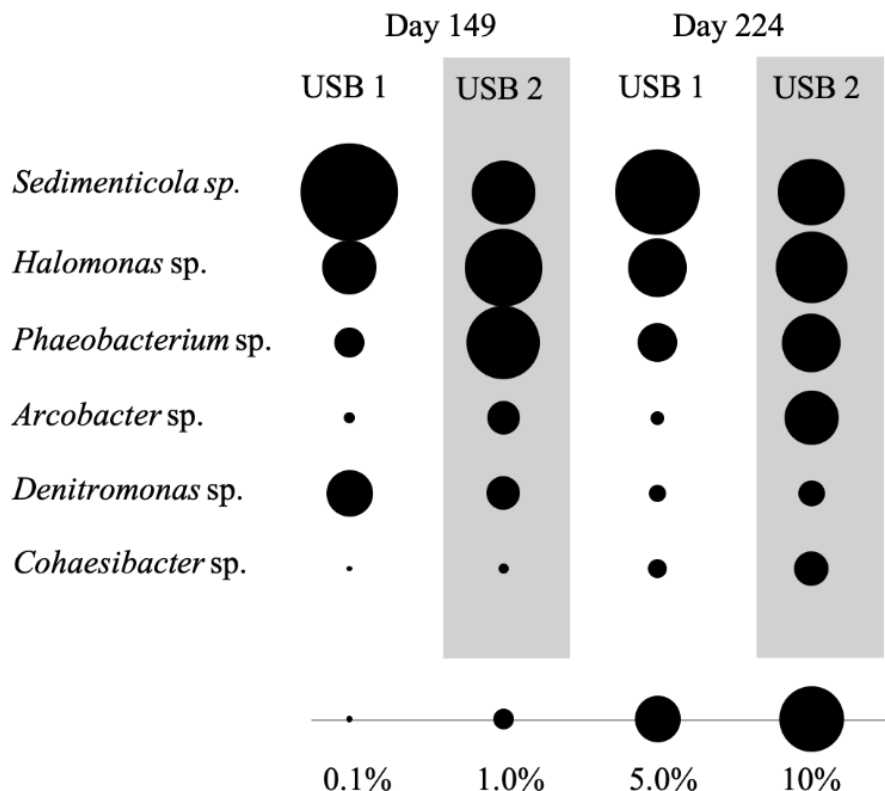


図 3-4 運転開始 149 と 224 日目の USB リアクター内に優占した脱窒細菌の検出率

3.3.5 閉鎖循環型陸上養殖システムにおける *E. bruneus* の成長

図 3-5 (A) は、実験期間中の *E. bruneus* の体長と体重の成長データである。初期の *E. bruneus* の体長は約 15.5cm、体重は約 60.0g であった。閉鎖循環型陸上養殖システム内の魚体密度は、 $4.11 \text{ kg-fish}\cdot\text{m}^{-3}$ から $8.69 \text{ kg-fish}\cdot\text{m}^{-3}$ へと徐々に増加した(図 3-5 (B))。151 日目には、魚体密度を下げるために *E. bruneus* の個体数を減らした。213 日目の *E. bruneus* の平均体重は $218\pm 46.6\text{g}$ 、平均体長は $25.2\pm 1.8\text{cm}$ であった。1 日あたりの体重増加率は $0.6\% \cdot \text{day}^{-1}$ であり、生物濾過槽と泡沫分離を用いた閉鎖循環型陸上養殖システムで *E. bruneus* を養殖した先行研究と同程度であった (Kuriyama, 2008)。一部の *E. bruneus* 標本では目に窒素病(ガス病)の症状が見られたが、死亡した魚はなかった。この症状は、窒素ガスが過剰に溶け込んだ用水で魚を飼育した際に、魚の組織内に窒素ガスが入り込むことで発生するが、水中の溶存窒素の蓄積と関係している可能性が示唆されている。窒素病の発生を抑制するための曝気を行うことが必要である。

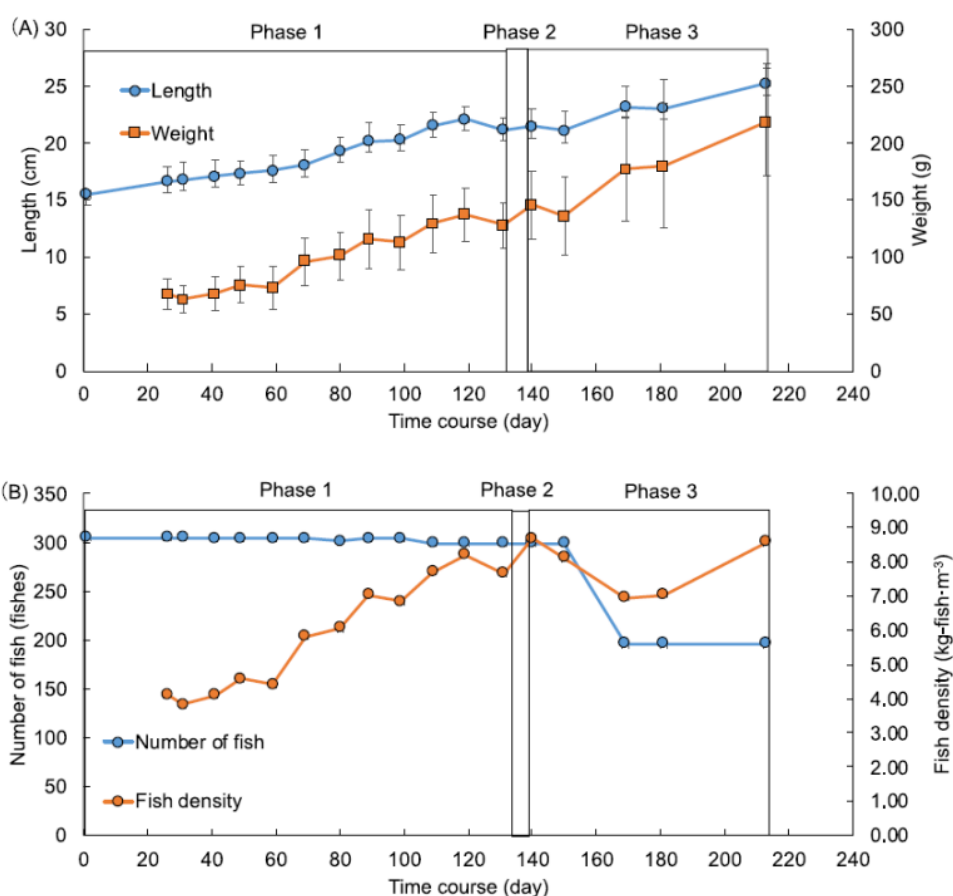


図 3-5. 本実験での (A) *Epinephelus bruneus* の成長率 (B) 飼育数と養殖密度

3.4 小括

E. bruneus を養殖する閉鎖循環型陸上養殖水槽の水処理技術として DHS-USB システムを用いた浄化技術を確立した。DHS リアクターは高い TAN 除去率を示すとともに養殖水槽への酸素供給を担っていることを明らかにした。酢酸ナトリウムを供給して運転した USB リアクターは $84 \pm 24\%$ と $91 \pm 21\%$ の硝酸塩除去率を示した。DHS と USB の保持汚泥内には硝化反応, Anammox 反応, 脱窒反応に関わる多種多様な微生物が検出され, 水質浄化の役割を担っていることが示唆された。以上のことから, 本研究で実証した DHS-USB システムは閉鎖循環型陸上養殖水槽の水処理技術として有望であり更なる大きな規模での実証試験が期待される。

参考文献

Adlin, N., Hatamoto, M., Hirakata, Y., Watari, T., Matsuura, N., Yamaguchi, T., 2017. Application of DHS-USB system and ozone in recirculating freshwater aquaria towards zero water exchange aquaria. Lect. Notes Civ. Eng. 4, 43–49.

APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater 21.

Araki, N., Ohashi, A., Machdar, I., Harada, H., 1999. Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponge-cubes as attachment site. Water Sci. Technol. 39, 23–31

Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J., 2012. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. Aquac. Eng. 51, 26–35.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat. Methods 7, 335–336.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms.

ISME J. 6, 1621–1624.

d'orbcastel, E.R., Blancheton, J.P., Belaud, A., 2009. Water quality and rainbow trout performance in a Danish Model Farm recirculating system: Comparison with a flow through system. *Aquac. Eng.* 40, 135–143.

De Lourdes Cobo, M., Sonnenholzner, S., Wille, M., Sorgeloos, P., 2014. Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquac. Res.* 45, 470–475.

Díaz, V., Ibáñez, R., Gómez, P., Urtiaga, A.M., Ortiz, I., 2012. Kinetics of nitrogen compounds in a commercial marine Recirculating Aquaculture System. *Aquac. Eng.* 50, 20–27.

Furukawa, A., Matsuura, N., Mori, M., Kawamata, M., Kusaka, J., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., 2016. Development of a DHS-USB recirculating system to remove nitrogen from a marine fish aquarium. *Aquac. Eng.* 74, 174–179.

González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Quesada, E., Béjar, V., 2009. *Halomonas fontilapidosi* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1290–1296.

Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S.K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T.Z., Petrosino, J.F., Knight, R., Birren, B.W., 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 21, 494–504.

Hatamoto, M., Okubo, T., Kubota, K., Yamaguchi, T., 2018. Characterization of downflow hanging sponge reactors with regard to structure, process function, and microbial community compositions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 10345–10352.

Hlaváč, D., Adámek, Z., Hartman, P., Másilko, J., 2014. Effects of supplementary feeding in carp ponds on discharge water quality: A review. *Aquac. Int.* 22, 299–320.

Homchoam, T., Yoochatchaval, W., 2019. Removal of Ammonia from Aquaculture Wastewater by Down-flow Hanging Sponge System 33, 59–68.

Huang, Z., Jiang, Y., Song, X., Hallerman, E., Peng, L., Dong, D., Ma, T., Zhai, J., Li, W., 2018.

Ammonia-oxidizing bacteria and archaea within biofilters of a commercial recirculating marine aquaculture system. *AMB Express* 8, 1–12.

Kim, K.K., Jin, L., Yang, H.C., Lee, S.T., 2007. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 675–681.

Kubota, K., Hayashi, M., Matsunaga, K., Iguchi, A., Ohashi, A., Li, Y.Y., Yamaguchi, T., Harada, H., 2014. Microbial community composition of a down-flow hanging sponge (DHS) reactor combined with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for the treatment of municipal sewage. *Bioresour. Technol.* 151, 144–150.

Kuriyama, I., 2008. Rearing trial of kelp grouper *Epinephelus bruneus* using a closed recirculation culture system. *Bull. Mie Prefect. Fish. Res. Inst.* 16, 37–44.

Leung, K.M.Y., Chu, J.C.W., Wu, R.S.S., 1999. Nitrogen budgets for the areolated grouper *Epinephelus areolatus* cultured under laboratory conditions and in open-sea cages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 186, 271–281.

Limpiyakorn, T., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C., Polprasert, C., 2011. Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 102, 3694–3701.

Liu, D., Li, C., Guo, H., Kong, X., Lan, L., Xu, H., Zhu, S., Ye, Z., 2019. Start-up evaluations and biocarriers transfer from a trickling filter to a moving bed bioreactor for synthetic mariculture wastewater treatment. *Chemosphere* 218, 696–704.

Mac Conell, E.F.A., Almeida, P.G.S., Martins, K.E.L., Araújo, J.C., Chernicharo, C.A.L., 2015. Bacterial community involved in the nitrogen cycle in a down-flow sponge-based trickling filter treating UASB effluent. *Water Sci. Technol.* 72, 116–122.

Mori, K., Harayama, S., 2011. *Methanobacterium petrolearium* sp. nov. and *Methanobacterium ferruginis* sp. nov., mesophilic methanogens isolated from salty environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 138–143.

Narasingarao, P., Häggblom, M.M., 2006. *Sedimenticola selenatireducens*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic selenate-respiring bacterium isolated from estuarine sediment. Syst. Appl. Microbiol. 29, 382–388.

Neto, I.A., Brandão, H., Furtado, P.S., Wasielesky, W., 2019. Acute toxicity of nitrate in *Litopenaeus vannamei* juveniles at low salinity levels. Cienc. Rural 49, 1–9.

Onodera, T., Okubo, T., Uemura, S., Yamaguchi, T., Ohashi, A., Harada, H., 2016. Long-term performance evaluation of down-flow hanging sponge reactor regarding nitrification in a full-scale experiment in India. Bioresour. Technol. 204, 177–184.

Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M.C., Koops, H.P., 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. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5368–5382.

Qin, W., Heal, K.R., Ramdasi, R., Kobelt, J.N., Martens-Habbena, W., Bertagnolli, A.D., Amin, S.A., Walker, C.B., Urakawa, H., Könneke, M., Devol, A.H., Moffett, J.W., Armbrust, E.V., Jensen, G.J., Ingalls, A.E., Stahl, D.A., 2017. *Nitrosopumilus maritimus* gen. nov., sp. nov., *Nitrosopumilus cobalaminigenes* sp. nov., *Nitrosopumilus oxyclinae* sp. nov., and *Nitrosopumilus ureiphilus* sp. nov., four marine ammoniaoxidizing archaea of the phylum thaumarchaeo. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67, 5067–5079.

Rychly, J., 1980. Nitrogen balance in trout: II. Nitrogen excretion and retention after feeding diets with varying protein and carbohydrate levels. Aquaculture 20, 343–350.

Satanwat, P., Tran, T.P., Hirakata, Y., Watari, T., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., Pungrasmi, W., Powtongsook, S., 2020. Use of an internal fibrous biofilter for intermittent nitrification and denitrification treatments in a zero-discharge shrimp culture tank. Aquac. Eng. 88, 102041.

Song, X., Yang, X., Hallerman, E., Jiang, Y., Huang, Z., 2020. Effects of hydraulic retention time and influent nitrate-n concentration on nitrogen removal and the microbial community of an aerobic denitrification reactor treating recirculating marine aquaculture system effluent. Water (Switzerland) 12, 1–19.

Tal, Y., Watts, J.E.M., Schreier, H.J., 2006. Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox)

Bacteria and Associated Activity in Fixed-Film Biofilters of a Marine Recirculating Aquaculture System. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2896–2904.

Uemura, S., Okubo, T., Maeno, K., Takahashi, M., Kubota, K., Harada, H., 2016. Evaluation of water distribution and oxygen mass transfer in sponge support media for a down-flow hanging sponge reactor. Int. J. Environ. Res. 10, 265–272.

Watari, T., Mai, T.C., Tanikawa, D., Hirakata, Y., Hatamoto, M., Syutsubo, K., Fukuda, M., Nguyen, N.B., Yamaguchi, T., 2017. Development of downflow hanging sponge (DHS) reactor as post treatment of existing combined anaerobic tank treating natural rubber processing wastewater. Water Sci. Technol. 75, 57–68.

Yoshii, K., Takakuwa, F., Nguyen, H.P., Masumoto, T., Fukada, H., 2010. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization of juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus*. Fish. Sci. 76, 139–145

第4章 微細藻類-細菌共生系プロセスとバッフルドリアクターによる新規窒素除去システムの開発

4.1 はじめに

微細藻類と硝化細菌を共生させたプロセスでは以下の利点を有するため広く研究が行われている (Subashchandrabose et al., 2011). (1) 微細藻類の光合成によって酸素を補うため、曝気が不必要で省エネルギー, (2) 微細藻類による窒素同化による無機窒素化合物の除去, (3) 収穫された微細藻類からのバイオ燃料や肥料, 動物や水生生物の飼料などの副産物の生産 (Akizuki et al., 2020; Rizwan, M. et al., 2018).

これまでに微細藻類と硝化細菌を共生させたプロセスは様々なリアクターを用いた窒素除去の報告があるが, 多くのリアクターで微細藻類のバイオマスが処理水とともに流出する問題がある. 微細藻類は小さな粒径 (2~30 μm), 水と同程度の密度, 沈降速度が遅い特徴をもつ (Cristina González-Fernández et al., 2013) ため, 多くの既往の報告では, 汚泥滞留時間 (Solids retention time: SRT) や水理学的滞留時間 (Hydraulic Retention Time: HRT) を制御することでバイオマスの流出を防いでいる. そこで, バイオマスをリアクター内に保持する方法として, バッフルドリアクターに着目した. バッフルドリアクターは簡易的な構造で SRT が長く, 高濃度でのバイオマスの保持, 各槽で様々な条件下で運転することが可能である. そこで本章では, 微細藻類-硝化細菌を共生させたプロセスによる窒素の除去を目的とし, 微細藻類-硝化細菌を共生させたプロセスとフォトバッフルドリアクターを組み合わせた, 微細藻類-硝化細菌フォトバッフルドリアクターによる人工模擬廃水の連続処理実験を行い, その窒素の除去特性を評価した.

4.2 実験方法

4.2.1 フォト・バッフルド・リアクターのシステムの説明

図 4-1 は, 本研究で使用したフォト・バッフルド・リアクターの概略図である. 装置は 30°C に保たれた恒温室に置かれ, 外径 48 mm, 内径 40 mm, 高さ 450 mm の透明なポリ塩化ビニル製パイプ 6 本 (R1~R6) で構成され, パイプは管継手で接続されている. R1 から R6 までのパイプを上下交互に接続し, 有効容積は合計 3.2 L とした. フォト・バッフルド・リアクターの総容積から, 実験期間中の水理学的滞留時間を 2 日と計算した. リアクター内の液体の表面速度は $1.47 \times 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ であった. パイプ R2 には, 300Lx の LED ライト (LDL-301, アイリスオーヤマ) を 3 台用いて, 24 時間連続的に光が供給された. R2 の中央に光が当たるように LED ライトを設置した. R2 の中央部の光量

ドリアクターの概略図

は、200 日目に $413\mu\text{mol}\cdot\text{m}_2^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ であるとした。廃水タンクからの流入水をチューブポンプでパイプ R1 に連続的に供給し、流出水をパイプ R6 から排出した。フォト・バッフルド・リアクターに *Chlorella vulgaris* (NEIS-2170) を植菌し、前の研究と同様にアンモニア濃度 $10\text{-}50\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ で 16 日間培養した。その後、長岡市下水処理センターの活性汚泥法で得られた好気性汚泥（混合液体懸濁固形物（MLSS）： $3,315\pm 31\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，混合液体揮発性懸濁固形物（MLVSS）： $791\pm 18\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）50 mL を R1 に植菌し、硝化を開始した。

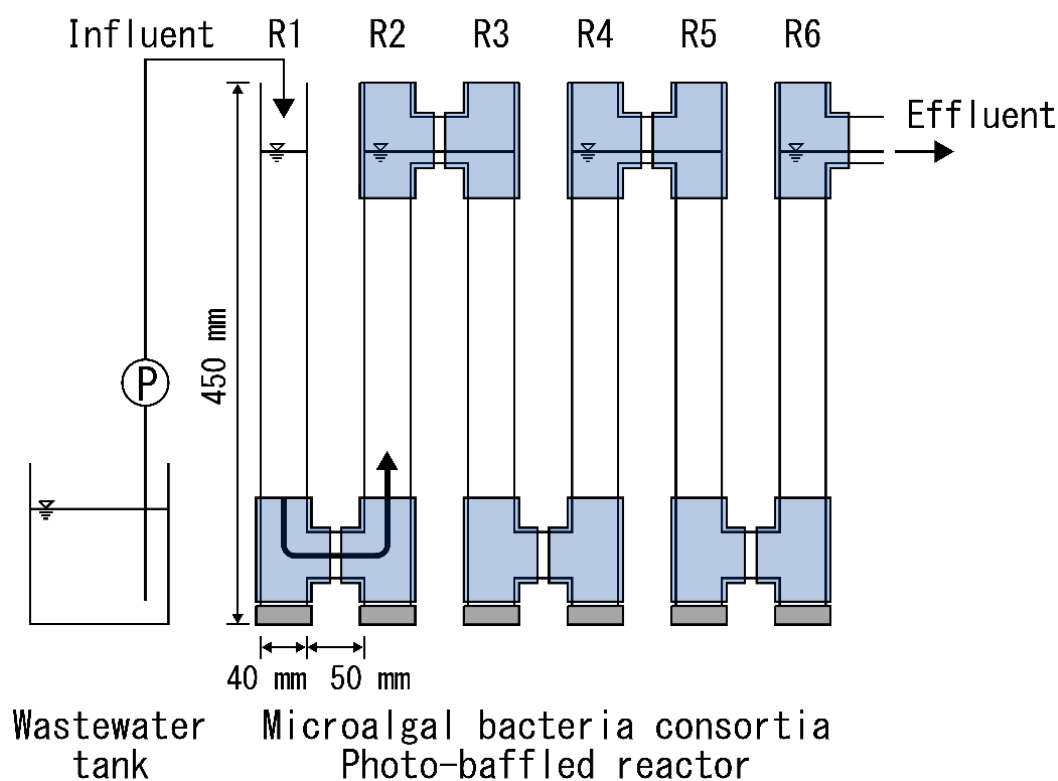


図 4-1 微細藻類-硝化細菌フォトバッフル

4.2.2 合成廃水

表 4-1 に、今回使用したアンモニウムナトリウムを主成分とする合成廃水の組成を示す。流入アンモニア濃度は $180\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ に維持された。合成廃水の pH は、すべての化合物を溶解した後、 $600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の炭酸水素ナトリウムを用いて 8.0 に調整した。さらに、

流入水に微量元素を $0.5\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加した ($\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O} : 22\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O} : 5.06\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{CoCl}_2\cdot 9\text{H}_2\text{O} : 1.61\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O} : 1.57\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{H}_3\text{BO}_3 : 11.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O} : 4.99\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O} : 1.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $4\text{Na EDTA}\cdot 4\text{H}_2\text{O} : 50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). 週1回, 合成廃水を調製した.

表 4-1 人工模擬廃水および微量元素の組成

人工模擬廃水			
Compound	Concentration (mg L^{-1})		
	Phase 1 (1~7日目)	Phase 2 (8~16日目)	Phase 3 (17~365日目)
NH_4Cl	19.8	150	750
NaHCO_3	600	600	850
Na_2CO_3	-	-	265
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	25
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	140
KH_2PO_4	-	-	350

微量元素	
Compound	Concentration (g L^{-1})
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.06
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.61
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.57
H_3BO_3	11.4
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.99
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.1
$4\text{Na}\cdot\text{EDTA}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50

4.2.4 運転条件

微細藻類-硝化細菌フォトバツフルドリアクターは *C. vulgaris* の植種から 365 日間, 連続運転を行った. 実験期間中は本リアクターを 30°C に維持した恒温室内に設置して

運転を行った。

表 4-2 に全期間の実験装置の運転条件を示す。HRT を 2 日に設定し、Phase 1（運転 1 日目～7 日目）と Phase 2（運転 8 日目～16 日目）では *C. vulgaris* の培養を行った。この Phase 1, Phase 2 では本リアクターからの処理水を R1 に返送し、処理水循環運転を行った。Phase 1, Phase 2 における供試廃水の初期の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は Phase 1 では 10 mg-N L^{-1} 、Phase 2 では 50 mg-N L^{-1} に設定した。また、藻類の光合成による槽内の pH の上昇を抑えるために、R2 にエアレーションポンプを用いて空気を送風した。Phase 3（運転 17 日目～365 日目）では、R2 への空気を送風を停止し、運転方法を処理水循環運転からワンパス運転に変更した。R1 に長岡中央浄化センターから採取した活性汚泥を 50 mL 投入した後、供試廃水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度を 180 mg-N L^{-1} に設定し、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の処理性能を評価した。

表 4-2 微細藻類-硝化細菌フォトバッフルドリアクターの運転条件

期間 (days)		$\text{NH}_4^+\text{-N} (\text{mg-N L}^{-1})$	運転方法
Phase 1	1~7	10 (初期値)	処理水循環
Phase 2	8~16	50 (初期値)	処理水循環
Phase 3	17~365	180	ワンパス

4.2.3 分析方法

サンプル水は、3 日ごとに流入口、各カラムの表面、および流出口から採取した。流出水サンプルは、BR の出口にサンプリングボトルを固定して採取した。水質プロファイリングのために、保持したバイオマスサンプルを BR の中層から採取した。pH は、ポータブル pH メーター (D-52, 堀場製作所) で測定した。温度と DO は、ポータブル DO メーター (HQ30d, HACH 社) を用いて取得した。滞留汚泥の総懸濁物質 (TSS) と揮発性懸濁物質 (VSS)、シード汚泥の MLSS と MLVSS を標準的な方法で分析した (Brandi and Wilson-Wilde, 2013)。TSS および VSS の分析には、直径 $1.0 \mu\text{m}$ のガラス繊維フィルター (GF/B, Whatman 社) を使用した。アンモニアは、分光器 (DR-2800, HACH) を用いて測定した。硝酸塩と亜硝酸塩は、 $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過した後、高速液体クロマトグラフ (LC-20AT, 島津製作所) で分析した。クロロフィル-a は、標準法 (NEN-6520) に基づいて測定した。光子束密度は、フルスペクトル量子メーター (MQ-500,

Apogee 社) を用いて測定した。

4.2.4 統計解析

窒素および有機化合物の除去効率の有意差を判断するための統計的比較として、結果を平均値±標準誤差で示し、一元配置の ANOVA を用いて比較した。平均値は、 $p < 0.05$ で有意に異なるとした。

4.3 実験結果および考察

4.3.1 フォトバッフルドリアクターのプロセス性能

フォト・バッフルド・リアクターを 30°C の恒温室で運転し、350 日間の窒素除去性能を評価した。図 4-2 は、実験期間中の流入水と流出水のアンモニア、亜硝酸、硝酸の濃度を時系列で示したものである。最初の 14 日間は、流出水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸の濃度が大きく変動した。起動期間中、フォト・バッフルド・リアクターに通すことで pH が 8.3 から 8.8 に上昇し、二酸化炭素が微細藻類に利用されていることがわかった。起動後、硝化作用により流出水の pH が低下し、14 日目には流出水中のアンモニアが $53.2 \text{ mg-N} \cdot \text{day}^{-1}$ に達した。15 日目から 350 日目までの流入アンモニア濃度は $166 \pm 24 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ 、流出アンモニア濃度は $57 \pm 18 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ であり、フォト・バッフルド・リアクターによるアンモニア除去効率は $67 \pm 11\%$ であった。流出水中の TSS と VSS は、30 日目から 140 日目までの間に、それぞれ $13 \pm 7.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ と $6.4 \pm 4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ となった。

これまでの研究では、微細藻類と硝化細菌の複合体による完全な硝化が報告されている (González et al., 2008; Karya et al., 2013)。しかし、本研究で開発したフォト・バッフルド・リアクターのアンモニア除去効率は、先行研究で報告されたものよりも低いものであった。さらに、流出水中の亜硝酸濃度は 26 日目以降に大きく上昇し、この時期にはフォト・バッフルド・リアクター内の DO の上昇 (例えば、29 日目の R2 の DO は $8.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) も確認された。微細藻類がリアクター内で成長して酸素を生成し、その酸素が硝化細菌 (4.3.2 項参照) に利用されていたようである。しかし、フォト・バッフルド・リアクターでは完全な硝化は見られず、29 日目以降は流出水中の亜硝酸濃度が上昇した。60 日目から 350 日目までの流出水中の亜硝酸濃度は $60 \pm 26 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ であり、フォト・バッフルド・リアクターで長期的に安定した部分硝化が達成されていることがわかった。本研究における亜硝酸生成速度は $0.030 \pm 0.009 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 、窒素負荷速度 (NLR) は $0.083 \pm 0.011 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ と算出された。これまでの多くの研究で、高い NLR 条件 (例: $1.0 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 以上) で安定した部分的な硝化が達成されたことが報告されている (Okabe et al., 2011)。それにもかかわらず、我々の研究では、AOB と NOB

の間の酸素の競合, FA 濃度, および BR の光強度により, NLR が低くても部分的な硝化が起こることがわかった (4.3.2 項参照).

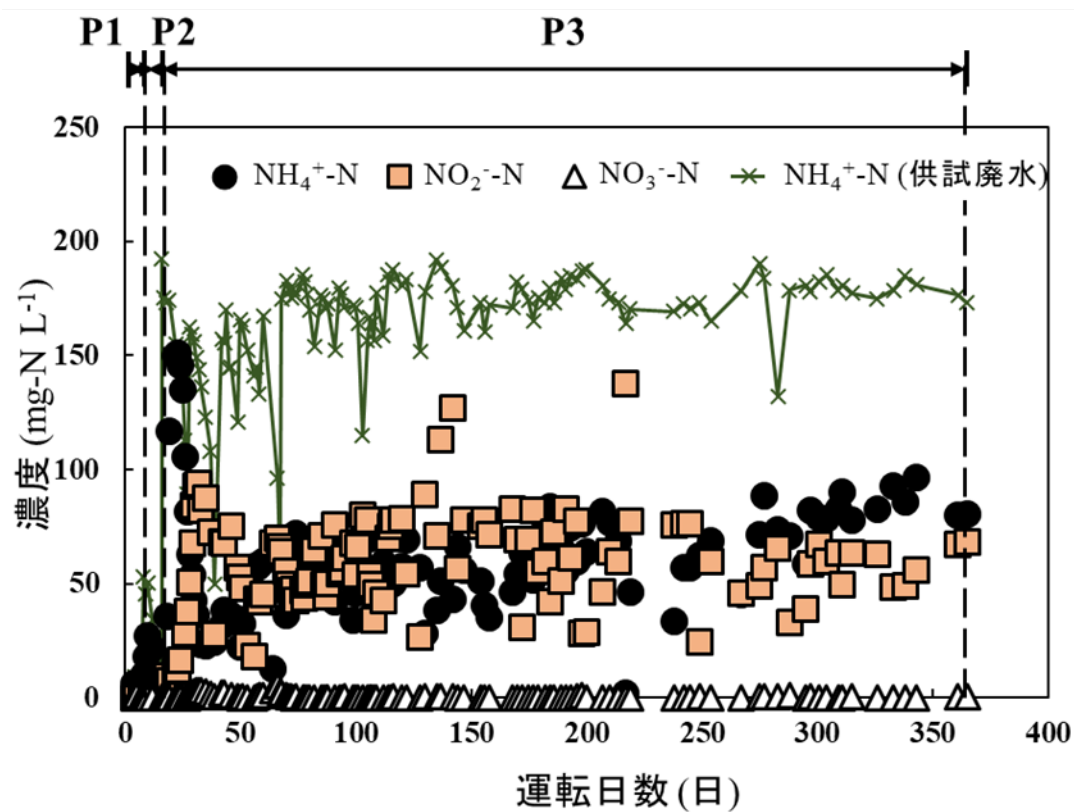


図 4-2 NH₄⁺-N, NO₂⁻-N, NO₃⁻-N の経日変化

4.3.2 フォトバッフルドリアクターの水質プロファイル

図 4-3 は、200 日目と 350 日目のカラムにおけるアンモニア、亜硝酸、クロロフィル-a の水質プロファイルである。200 日目、各カラムの pH は約 8.0、DO は各カラムの水面付近で $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。流入水のアンモニア濃度は $187.7 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ 、R6 のアンモニア濃度は $106.3 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。R3 から徐々に亜硝酸の蓄積が見られ、R6 では 200 日目に $31.6 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ の亜硝酸濃度となった。さらに、R6 と流出水の間で大量の亜硝酸が発生した。この亜硝酸生成は、流出水サンプリングポイントまでの間にバイオフィルムが成長した可能性を示している。しかし、硝酸塩は各カラムとも低く、R6 ではわずか $0.08 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。流入水の TN 濃度は $188.1 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ 、R6 での TN 濃度は $137.9 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ であり、廃水が R6 に到達したときの窒素除去効率は 27% であった。

200 日目に VSS とクロロフィル-a 濃度が最大となったのは、R2 で光強度が最も高い $413 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ のゾーンであった (図 4-3)。R2 で 37 日目と 200 日目の VSS がそれぞれ $93 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と $950 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ であることから、フォト・バッフルド・リアクターでバイオマスが成長していることがわかる。R2 でのクロロフィル-a は $4240 \pm 360 \mu\text{g}\cdot\text{chlorophyll-a}\cdot\text{L}^{-1}$ であり、*C. vulgaris* の成長を目視で確認できた。流出水中の VSS は $48 \text{ mg}\cdot\text{VSS}\cdot\text{L}^{-1}$ 、クロロフィル-a は $7.4 \pm 0.9 \mu\text{g}\cdot\text{chlorophyll-a}\cdot\text{L}^{-1}$ となり、フォト・バッフルド・リアクターがバイオマスを効果的に保持できることがわかった。このフォト・バッフルド・リアクターで観測されたバイオマスの保持量は、これまでの研究とほぼ同じであった (Rada-Ariza et al., 2017; Jia et al., 2018)。そのため、微細藻類の成長はフォト・バッフルド・リアクター内で行われ、成長したバイオマスはリアクター内に保持されていた。

350 日目には、各カラムの pH は約 8.0、DO は水面付近でそれぞれ $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ となった。流入水のアンモニア濃度は $173.0 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ 、流出水のアンモニア濃度は $80.3 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ となり、アンモニア除去効率は 200 日目と比較して 66% から 53% に低下した。しかし、各カラムの亜硝酸塩と硝酸塩の濃度は、200 日目と同じ傾向を示した。亜硝酸塩の蓄積が依然として起こり、亜硝酸塩濃度は R6 で $29.6 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ 、流出水で $68.0 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。硝酸塩は各カラムでまだ低く、最終流出水では $0.15 \text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。そのため、350 日運転しても硝化反応は亜硝酸で止まり、このフォト・バッフルド・リアクターではアンモニアが部分的に硝化されていた。

200 日目には、R2 でクロロフィル-a が最も高い濃度で検出された。しかし、350 日目にはこの数値が著しく低下し、R2 のクロロフィル-a 濃度は R1, R3, R4 の各カラムよりも低くなっていた。その理由の一つは、リアクターのこの部分の光量が多いために *C. vulgaris* が増殖し、R2 リアクターの壁面に大量の藻類が付着し、光がカラムに入るのを

妨いでいたことである。 *C. vulgaris* では、光強度が $5\sim 10\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 以下では光合成が行われない (Degen et al., 2001)。 350 日目の R2 の底面の光量は $2\sim 65\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で、最大光量は $65\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ であった。 リアクターの表面に藻類が付着していたため、フォト・バフフルド・リアクター内の光量は測定値よりも低くなっていた。 運転開始から 350 日目の R2 では、他のバイオマスの成長がさらに高まり、クロロフィル-a 濃度が低下したと考えられる。 流出水中の VSS とクロロフィル-a 濃度は、 $14\ \text{mg}\cdot\text{VSS}\cdot\text{L}^{-1}$ と $0\pm 0\ \mu\text{g}\cdot\text{chlorophyll-a}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。

実験期間中、フォト・バフフルド・リアクターでは部分的に硝化が起こっていた。 これまでの研究では、微細藻類-窒素酸化細菌共生系における硝化反応は、完全な硝化であると報告されている (Arashiro et al., 2017; Kariya et al., 2013)。 DO や遊離アンモニア (FA) など、いくつかの要因が硝化細菌の増殖を阻害する要因として指摘されている (Cao et al., 2017)。 AOB と NOB の DO 半飽和係数は、それぞれ $1.2\sim 1.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.2\sim 0.4\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ で、NOB は低 DO 条件では阻害される (Foladori et al., 2018; Risgaard-Petersen et al., 2004)。 我々のリアクターでは、各カラムの水面付近の DO は $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下であり、各水槽の底部付近では DO 濃度はもっと低いと想定されていた。 また、処理工程のほとんどで、亜硝酸が $24.5\sim 137.8\ \text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ の濃度で蓄積されていた。 そのため、NOB の活性は AOB との酸素の競合により抑制されていると考えられていた。 また、フォト・バフフルド・リアクターでも、*C. vulgaris* と硝化細菌の間で競争が起こっていた可能性がある。 ベントスの微細藻類は、硝化細菌よりも高い窒素吸収速度を持ち、硝化細菌よりも早く成長する可能性がある (Risgaard-Petersen et al., 2004)。 微細藻類と硝化細菌の共生プロセスに関するこれまでの研究では、リアクター内の攪拌により微細藻類が蓄積しないため、硝化細菌との競合はほとんど見られなかった (Rada-Ariza et al., 2019; Fladori et al., 2018)。 しかし、*C. vulgaris* はフォト・バフフルド・リアクターの底部付近に堆積したことから、*C. vulgaris* と硝化細菌は競争的な環境にあると考えられる。 したがって、部分的な硝化に対する攪拌機の有無の影響については、今後さらに検討する必要がある。

200 日目と 350 日目の FA 濃度は、各カラムでそれぞれ $10\sim 16\ \text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ と $14\sim 24\ \text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。 これまでの研究では、FA 濃度 $10\sim 150\ \text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ で AOB が阻害され、 $0.1\sim 1.0\ \text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ で NOB が阻害されることが報告されている (Anthonisen et al., 1976)。 したがって、フォト・バフフルド・リアクター内の FA 濃度が NOB の活性を阻害している可能性がある。 また、微細藻類-硝化細菌共生系では、 $140\sim 500\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 以上の光強度で、光による硝化細菌の活性阻害が報告されている (Vergara et al., 2016; Meng et al., 2019; Akizuki et al., 2019)。 我々のフォト・バフフルド・リアクターでは、 $200\sim 400$

$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の光量で照射している部分もあり、硝化細菌の活動を阻害するのに十分な明るさであったのかもしれない。NOB は AOB よりも光の影響を強く受けるため (Vergara et al., 2016), バッフルリアクターでの長期安定的な部分硝化の原因になっていると考えられる。今後は、フォト・バッフルド・リアクターで発生した部分的硝化のメカニズムを解明し、プロセス性能の安定化を図るとともに、実際の廃水処理で実証することが望まれる。

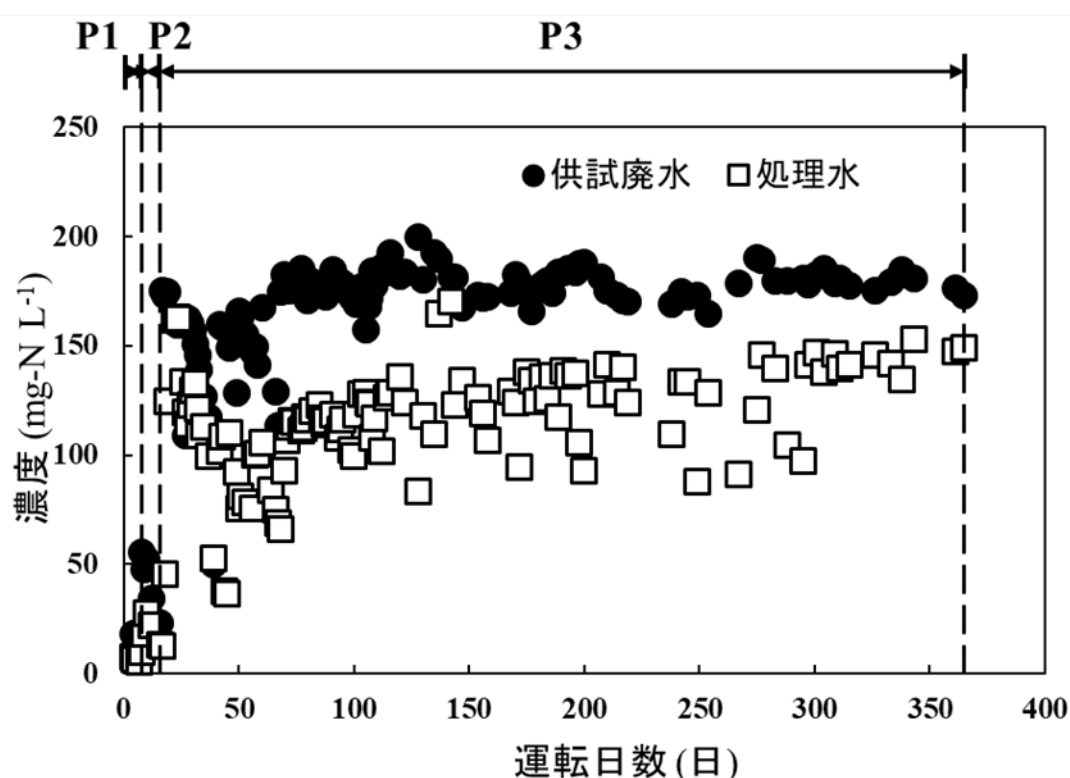


図 4-3 TN ($\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の総和) の経日変化

4.4 小括

本研究では、フォト・バッフルド・リアクターを用い、微細藻類-硝化細菌コンソーシアムによる $180 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ までのアンモニア処理性能の評価を行った。有効容積 3.2 L の 6 つのコンパートメントからなるリアクターを、 30°C で 350 日間連続運転し、窒素負荷速度が $0.083 \pm 0.011 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ のとき、全体で $66 \pm 11\%$ のアンモニアが除去された。また、流出水中の亜硝酸濃度が $60 \pm 26 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硝酸生成速度は $0.030 \pm 0.009 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ である。

$^3 \cdot \text{day}^{-1}$ と算出となり、長期的に安定した部分硝化が確認された。200日目と350日目には、亜硝酸酸化細菌（NOB）の活動が阻害されたため、各カラムの溶存酸素濃度と遊離アンモニア濃度は、それぞれ $0.3 \sim 0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $14 \sim 24 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ に低下した。微細藻類-硝化細菌コンソーシアムのフォト・バフフルド・リアクターでは、350日以上長期安定的な部分硝化が達成された。本リアクターの特殊な構成により、クロレラ・バルガリス (*Chlorella vulgaris*) と硝化細菌の間に競争環境が形成された。以上の結果、これらの微細藻類-硝化細菌コンソーシアムは、アナモックスプロセスの後処理のための、新しい部分硝化プロセスとなる可能性がある。今後は、本フォト・バフフルド・リアクターをさらに研究し、部分的硝化を安定させるための NOB 阻害のメカニズムを理解し、実際の廃水処理で実証する必要があると考えられる。

参考文献

- Akizuki, S., Kishi, M., Cuevas-Rodríguez, G., Toda, T., 2020. Effects of different light conditions on ammonium removal in a consortium of microalgae and partial nitrifying granules. *Water Research*, 171, 115445.
- Akizuki, S., Cuevas-Rodríguez, G., Toda, T., 2019. Microalgal-nitrifying bacterial consortium for energy-saving ammonia removal from anaerobic digestate of slaughterhouse wastewater. *Journal of Water Process Engineering*. 31, 100753.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., Srinath, E. G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Water Pollution Control Federation*, 835-852.
- Arashiro, L. T., Rada-Ariza, A.M., Wang, M., Van Der Steen, P., Ergas, S. J., 2017. Modelling shortcut nitrogen removal from wastewater using an algal-bacterial consortium. *Water Sci. Technol.* 75,782–792.
- Brandi, J., Wilson-Wilde, L., 2013. Standard methods, *Encycl. Forensic Sci.* 522–527.
- Cao, Y., van Loosdrecht, M.C.M., Daigger G.T., 2017. Mainstream partial nitritation–anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 1365–1383.

Cristina González-Fernández, Mercedes Ballesteros., 2013. Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods. *Journal of Applied Phycology*. 25, 991-999.

Degen, J., Uebele, A., Retze, A., Schmid-Staiger, U., Trösch, W., 2001. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of Biotechnology*. 92, 89-94.

Foladori, P., Petrini, S., Nessenzia, M., Andreottola, G., 2018. Enhanced nitrogen removal and energy saving in a microalgal-bacterial consortium treating real municipal wastewater. *Water Science and Technology*. 78, 174-182.

González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., Leon, C., Garcia, P. A., Munoz, R., 2008. Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photo-bioreactor using algae-bacteria consortia. *Water Science & Technology*. 58, 95-102.

Jia, H., Yuan, Q., 2018. Nitrogen removal in photo sequence batch reactor using algae-bacteria consortium. *Journal of Water Process Engineering*. 26, 108-115.

Karya, N. G. A. I., Van der Steen, N. P., Lens, P. N. L., 2013. Photo-oxygenation to support nitrification in an algal-bacterial consortium treating artificial wastewater. *Bioresource Technology*. 134, 244-250.

Meng, F., Xi, L., Liu, D., Huang, W., Lei, Z., Zhang, Z., Huang, W., 2019. Effects of light intensity on oxygen distribution, lipid production and biological community of algal-bacterial granules in photo-sequencing batch reactors. *Bioresource technology*. 272, 473-481.

Okabe, S., Oshiki, M., Takahashi, Y., Satoh, H., 2011. Development of long-term stable partial nitrification and subsequent anammox process, *Bioresour. Technol.* 102, 6801-6807.

Rada-Ariza, A. M., Fredy, D., Lopez-Vazquez, C. M., Van der Steen, N. P., Lens, P. N. L., 2019. Ammonium removal mechanisms in a microalgal-bacterial sequencing-batch photobioreactor at different solids retention times. *Algal Research*. 39, 101468.

Rada-Ariza, A. M., Lopez-Vazquez, C. M., Van der Steen, N. P., Lens, P. N. L., 2017. Nitrification

by microalgal-bacterial consortia for ammonium removal in flat panel sequencing batch photobioreactors. *Bioresource Technology*. 245, 81-89.

Risgaard-Petersen, N., Nicolaisen, M. H., Revsbech, N. P., Lomstein, B. A., 2004. Competition between Ammonia-Oxidizing Bacteria and Benthic Microalgae. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 5528-5537.

Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., & Rashid, N., 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 92, 394-404.

Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2011. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances*. 29, 896-907.

Vergara, C., Muñoz, R., Campos, J. L., Seeger, M., Jeison, D., 2016. Influence of light intensity on bacterial nitrifying activity in algal-bacterial photobioreactors and its implications for microalgae-based wastewater treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 114, 116-121.

第5章 総括

5.1 DHS-USB システムを用いた閉鎖循環型陸上養殖システムの開発のまとめ

閉鎖循環式で魚類飼育を行ううえでの海水管理技術に関して、本論文では、実験的検証を含む検討を行い、以下の知見を得た。

- ・海産魚であるクエを養殖する閉鎖循環型陸上養殖水槽の水処理技術として DHS-USB システムを用いた浄化技術を確立した。DHS リアクターは高い TAN 除去率を示すとともに養殖水槽への酸素供給を担っていることを明らかにした。酢酸ナトリウムを供給して運転した USB リアクターは $84 \pm 24\%$ と $91 \pm 21\%$ の硝酸塩除去率を示した。

- ・DHS と USB の保持汚泥内には硝化反応、Anammox 反応、脱窒反応に関わる多種多様な微生物が検出され、水質浄化の役割を担っていることが示唆された。

- ・以上のことから、本研究で実証した DHS-USB システムは閉鎖循環型陸上養殖水槽の水処理技術として有望であり更なる大きな規模での実証試験が期待される。

5.2 微細藻類-細菌共生系プロセスとバッフルドリアクターによる新規窒素除去システムの開発のまとめ

- ・フォト・バッフルド・リアクターを用い、微細藻類-硝化細菌コンソーシアムによる $180 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ までのアンモニア処理性能の評価を行い、以下の知見を得た。

- ・有効容積 3.2 L の 6 つのコンパートメントからなるリアクターを、 30°C で 350 日間連続運転し、窒素負荷速度が $0.083 \pm 0.011 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ のとき、全体で $66 \pm 11\%$ のアンモニアが除去された。また、流出水中の亜硝酸濃度が $60 \pm 26 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硝酸生成速度は $0.030 \pm 0.009 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ と算出となり、長期的に安定した部分硝化が確認された。

- ・200 日目と 350 日目には、亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活動が阻害されたため、各カラムの溶存酸素濃度と遊離アンモニア濃度は、それぞれ $0.3 \sim 0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $14 \sim 24 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ に低下した。微細藻類-硝化細菌コンソーシアムのフォト・バッフルド・リアクターでは、350 日以上長期安定的な部分硝化が達成された。

- ・本リアクターの特殊な構成により、クロレラ・バルガリス (*Chlorella vulgaris*) と硝化細菌の間に競争環境が形成された。

- ・以上の結果、これらの微細藻類-硝化細菌コンソーシアムは、アナモックスプロセスの後処理のための、新しい部分硝化プロセスとなる可能性がある。今後は、本フォト・

バッフルド・リアクターをさらに研究し、部分的硝化を安定させるための NOB 阻害のメカニズムを理解し、実際の廃水処理で実証する必要があると考えられる。

5.3 課題と今後の展望

閉鎖循環式の陸上水槽で養殖を行うためには、次の要点を踏まえた飼育水管理技術・システム構築の検討が必要となる。

- 1) 蓄積した硝酸を一定数値内に抑えるための脱窒技術の開発。
- 2) 養殖している魚類に適した水流と水温の確保。
- 3) 水槽外部からの病原菌の流入、及び内部での病原菌発生の抑減とこれらに対する殺菌技術。
- 4) これらを稼働させるための非常時でも長期間安定した電力の供給と省力化。

上記の1)に関しては、本研究で開発したシステムを用いて、水量に対するクエの魚体重比で2% (20 kg魚体重/m³) までの高密度飼育が可能であった(未発表)。魚体重がさらに増える場合には、DHS リアクターの増設および循環流量を増やすことで窒素除去能が向上すると考えられる。また、飼育魚体重もしくは尾数が増えることで糞や体表粘液といった固形排出物(浮遊性および沈降性汚泥)が増加する。本システムでは、DHS リアクターが一定の物理ろ過機能を発揮するが、汚泥の量が増えると DHS の目詰まりを引き起こす危険性がある。魚類養殖に特化した閉鎖循環型陸上養殖システムでは、DHS-USB リアクターに加えて、ドラム式フィルターや泡沫分離装置を流路に組み入れることで物理ろ過機能を図ることが必要であろう。

養殖対象種となる魚類は、魚食性(動物性)の種が多いため動物性タンパク質である魚粉を多く含有する飼料を必要とするが、近年では持続可能性の観点から、大豆ミールやコーンミールなどの植物性タンパク質含有飼料の開発が盛んになっている。しかし、クエのような魚食性魚類では、植物性タンパク質を十分に利用できずに未消化のまま排出することで水質悪化を招く危険性がある。用いる飼料によっても水質が変化し、DHS-USB リアクターに要求される処理能力が変わることを予見しておく必要がある。全世界的に陸上水槽で魚類養殖をするニーズは高まっており、初期導入コストが低く、管理や増設の容易な DHS-USB リアクターが普及していくことが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なる御指導と御協力を賜りました、山口隆司教授、幡本将史准教授、渡利高大助教、そして金沢大学理工学域自然科学研究科の竹内裕教授、長岡工業高等専門学校環境都市工学科の川上周司准教授、宇部工業高等専門学校物質工学科の野本直樹准教授には深甚なる敬意を、ここに表します。

また、社会人学生として学生生活において御支援を頂きました、渡邊高子様、重野晶子様、黒崎香織様には心から感謝申し上げます。

そして、本研究を行うにあたり様々な面で助力いただきました、山口研究室の学生、特に修士の皆様には重ねて感謝申し上げます。

最後に社会人学生として、5年間、研究を続ける事に対して全力で協力してくれた妻の存在は大きな支えとなりました。深く感謝の意を表し、本博士論文の結びといたします。

令和4年3月

中村 嘉伸