塩分濃度が海面埋立管理型廃棄物処分場 調整池底泥の硝化に及ぼす影響

Influence of Salinity on Nitrification by Sludges in Adjustment Lagoon at Sea Landfills

相子伸之¹、中西博隆¹、平 大輔²

¹地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所／〒583-0862 大阪府羽曳野市尺度442

²崇城大学生物生命学部応用生命科学科／〒860-0082 熊本県熊本市西区池田4-22-1

NOBUYUKI AIKO¹, HIROTAKA NAKANISHI¹, and DAISUKE HIRA²

¹Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefecture
/442, Shakudo, Habikino City, Osaka, 583-0862, Japan

²Faculty of Applied Life Science, Sojo University
/4-22-1, Ikeda, Nishi ward, Kumamoto City, Kumamoto, 860-0082, Japan

Abstract

Landfill leachate is a typical large source of nitrogenous wastewater. We have revealed that nitrification reaction occurs in the leachate lagoons at two sea landfill sites, “Sakai 7-3” and “Izumitsuoki”, located in Osaka Bay. By using nitrifying bacteria which are thought to be present in the lagoon sludge, it was expected that efficient nitrogen treatment could be performed in the leachate lagoon. In sea landfill sites, it is common that the salt concentration of leachate changes with the passage of time. In this study, a continuous nitrification test using synthetic leachate with a swim-bed reactor was conducted on the sludge samples of “Sakai 7-3” and “Izumitsuoki” lagoons, and the effect of salinity on the treatment efficiency was investigated. It was confirmed that the ammonia oxidation occurred promptly in the synthetic leachate containing 0.5% or 3.0% sodium chloride. In contrast, the inhibition of nitrite oxidation was remarkable in the Izumitsuoki sludge under high salinity of 3.0%. Then, the microbial community during continuous nitrification test, especially ammonia oxidizing bacteria and nitrite oxidizing bacteria were investigated. From these results, the nitrogen cycle in the lagoons was discussed.

Key words: sea landfill, leachate, ammonia oxidizing bacteria, nitrite oxidizing bacteria, salinity

1. はじめに

我が国の廃棄物最終処分場の約2,000箇所のうち海面埋立処分場は81箇所と数は少ないものの、その規模は大きく、管理型処分場としての残存容量の3分の1ほどを担っている¹⁾。また、経費も陸上埋立の10,000~40,000円/m³に対して、海面埋立では6,000~15,000円/m³と安価で

あり、経済性と我が国の限りある国土に考慮すると、海面埋立は将来的に重要度を増すことが考えられている。

管理型処分場の埋立終了後は処分場を廃止し跡地利用などを検討するが、廃止に至っては、ガスの発生がないこと、浸出水（保有水の集排水管出口で）が2年間を通じて放流水基準をクリアしているなどの条件を満たしていなければならない²⁾。廃止に至るまでの期間は非常に長

く、埋立終了から廃止までの期間は、浸出水の水質等を管理し続けなければならない。管理型処分場の浸出水は、埋め立てられた廃棄物に由来して、pHが高い、有機物濃度が高い、窒素濃度が高いなどの特性があり^{3),4)}、廃掃法の放流基準を遵守するために、廃止までの期間は浸出水の処理施設を稼働し続けなければならない、維持コストが膨大である。

一方で、堺第7-3区処分場あるいは泉大津沖処分場などの海面埋立処分場では処理施設に配水する浸出水の水量を調整する調整池において、約1ヶ月程度の滞留期間中に流入する窒素濃度に比べて5割程度低下することが確認された⁵⁾。これらの処分場では、近年、噴水や散気装置の設置により、浸出水の循環と好気化を図っており、処理施設前段での前処理が期待されている。浸出水中の窒素のほとんどはアンモニア態窒素であり、調整池内で微生物による脱窒あるいはアナモックスなどの窒素除去が起こるとするならば必然的にアンモニア酸化が起きていると考えられた。調整池の底泥には、浸出水の環境に適した土着の微生物群集が自然に集積されており、浸出水に適した効率的な窒素処理に貢献していると考えられるが、微生物種や硝化特性などについて未だに不明な点が多く、十分に検証なされてこなかった。特に海面埋立処分場では、埋立処分の工程から調整池に塩分を含む浸出水が流入し、その塩分濃度は短期的にも長期的にも変化する。高い塩分濃度は亜硝酸酸化を阻害することについて多く報告⁶⁾⁻⁸⁾があり定説となっている一方で、阻害を受けないという相反する事例⁹⁾⁻¹³⁾もいくつか報告されている。塩分濃度の変化が調整池のアンモニア酸化細菌(AOB)と亜硝酸酸化細菌(NOB)に及ぼす影響を明らかにすることは、調整池の自浄作用を用いた窒素処理運転の軽減や、調整池に土着の微生物を用いた浸出水の効率的な窒素処理技術開発に重要である。そこで本研究では、調整池に堆積する底泥に存在するAOBとNOBを集積し、窒素循環に貢献する種組成を調べるとともに、アンモニア酸化活性あるいは亜硝酸酸化活性と塩分濃度の関係について検証した。また、これらの結果をもとに処分場調整池における窒素循環についても一考察をした。

2. 材料と方法

2.1 底泥の採取

堺7-3区処分場、および泉大津沖処分場の2つの海面埋立処分場の調整池から底泥試料を採取した。

堺7-3区の産業廃棄物管理型処分場は、平成6年に海

面埋立が終了した埋立地に覆土した上に、一部を管理型処分場として陸上埋立した。廃棄物は平成16年3月まで受け入れられ、平成18年には覆土まで完了している。陸上埋立部は遮水シートにより遮水されており、浸出水は有孔管で集められ、ポンプにより本研究の調査地の1つであるT調整池(以下、堺調整池)に排水される(Fig. 1)。堺調整池は、容量12,000 m³で、面積は20,000 m²、平均水深0.6 mである。ポンプ施設が2つあり(それぞれ、Pピット、VWYピット)、2つの配管により400~500 m³が流入する。なお、この調整池の滞留時間は約1ヶ月であり、その後は処理施設に送られる。

泉大津沖処分場の管理型区画は、平成4年に海面埋立として廃棄物の受け入れを開始し、平成14年3月に受け入れを終了している⁴⁾。各区画の浸出水は、集水暗渠を経て、最終的には集水暗渠末端A、およびBからポンプにより本研究の調査地である内水ポンド(以下、泉大津調整池)に送られる(Fig. 2)。調整池は、容量200,000 m³で、面積は40,000 m²、平均水深5.0 mである。約1~3ヶ月滞留し、調整池に併設された処理施設で処理され排出される。

堺調整池では、浸出水の流入付近と中心付近の2地点から底泥をエックマンバージ採泥器で採取し、等量を混ぜて硝化試験に供した(Fig. 1)。また、泉大津調整池では、浸出水の2つの流入付近の地点から底泥を同様に採取し、等量を混ぜて硝化試験に供した(Fig. 2)。それぞれの調整池では、堺調整池と泉大津調整池で、それぞれ2011年11月30日と2011年11月8日に底泥を採取した。底泥採取日の調整池および浸出水の水質をTable 1およびTable 2に示す。浸出水に対して、調整池水の窒素濃度は低かった。また、浸出水、調整池水のどちらも窒素の多くはアンモニア態窒素(NH₄-N)として存在し、亜硝

Fig. 1 Overview map of Sakai lagoon (1, St.1 and St.2, Sampling point of sediment; P, Outflow pump)

Fig. 2 Overview map of Izumiotsu lagoon (1, St.1 and St.2, Sampling point of sediment; P, Outflow pump; TF, Water purification treatment facility)

酸態窒素 ($\text{NO}_2\text{-N}$) 濃度あるいは硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) 濃度は定量下限値以下であり、これまで報告されている結果⁵⁾と一致した。

2.2 揺動床連続処理装置を用いた硝化試験

内寸が、幅14 cm、奥行き10.5 cm、深さ50 cmの透明塩化ビニール製角型容器に、底面から37 cmのところから塩化ビニール管を付属し、ゴムホースを接管してオーバーフローした処理水を500 mLの円すい型メスシリンダーで受けるようにした (Fig. 3)。

この角形容器には、流入側に幅3 cm、オーバーフロー配管側に幅10.5 cmとなるように、厚さ0.5 cmの仕切り板を設置した。この仕切り板には、上方と下方を7.5 cm角で切り抜いた。流入側の仕切り板の下方にはエアレーション用の配管とエアストーンを設置しエアポンプで曝気

Table 1 Water qualities in the surface layer(S) and bottom(B) of the sites near leachate inflow and outflow in Sakai Lagoon.

Analysis items	Unit	Lagoon			Leachate	
		Inflow-S	Outflow-S	Outflow-B ¹⁾	A	B
Depth	m	0.7	2.4			—
Temperature	℃	14.4	13.9	12.4	19.4	19.3
pH	—	11.0	9.4	9.0	12.5	12.0
Electric conductivity	S/m	0.509	0.506	0.503	0.601	0.764
Redox potential	mV	180	29	25	-243	-290
Dissolved oxygen	mg/L	2.3	6.7	5.8	3.8	2.7
Salt	%	0.07	0.07	0.07	0.18	0.27
TN	mg/L	21.2	16.7	18.6	36.0	28.4
$\text{NH}_4\text{-N}$	mg/L	19.9	15.1	13.2	32.9	26.1
$\text{NO}_2\text{-N}$	mg/L	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
$\text{NO}_3\text{-N}$	mg/L	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
DOC	mg/L	30.0	22.2	19.8	56.7	34.0

1) Water depth at the survey spot was 1.5 meters from the surface.

Table 2 Water qualities in the surface layer(S), middle layer(M), and bottom(B) of the sites near leachate inflow and outflow in Izumiotsu lagoon.

Analysis items	Unit	Lagoon									Leachate	
		Inflow-1-S	Inflow-1-M ¹⁾	Inflow-1-B ²⁾	Inflow-2-S	Inflow-2-M ¹⁾	Inflow-2-B ²⁾	Outflow-S	Outflow-M ¹⁾	Outflow-B ²⁾	A	B
Depth	m		6.5			5.5			6.0		—	—
Temperature	℃	19.4	18.3	15.9	18.8	18.2	16.6	19.2	18.3	16.2	22.5	21.9
pH	—	9.3	8.3	7.6	9.1	8.3	7.7	9.1	8.3	7.4	11.7	12.1
Electric conductivity	S/m	1.415	2.364	4.761	1.382	1.675	4.707	1.414	1.988	4.777	1.621	1.361
Redox potential	mV	-375	-344	-334	-400	-380	-358	-343	-356	-361	-328	-381
Dissolved oxygen	mg/L	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.3	0.2	1.4	0.6
Salt	%	0.90	0.91	3.57	0.87	0.90	3.17	0.88	0.90	3.15	1.04	0.80
TN	mg/L	44.8	40.5	29.5	16.7	40.7	34.0	39.1	38.9	32.2	102.1	80.2
$\text{NH}_4\text{-N}$	mg/L	29.0	24.6	21.3	15.1	25.4	25.5	24.5	32.3	27.3	82.9	49.4
$\text{NO}_2\text{-N}$	mg/L	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
$\text{NO}_3\text{-N}$	mg/L	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
DOC	mg/L	68.5	60.4	12.4	22.2	58.6	19.7	58.6	59.3	20.6	174	111.2

1) Each water depth at the survey spots was 3.0 meters from the surface.

2) Each water depth at the survey spots was 0.5 meters from the bottom.

Fig. 3 Schematic diagram of the reactor used in this study (1, Influent tank; 2, Inflow pump; 3, Reactor; 4, Biofringe; 5, Air pump; 6, Air stone; 7, Partition plate; 8, Effluent tank). Synthetic leachate flows from the influent tank to the reactor using the inflow pump. The solid arrows indicate the process flow. The block arrows indicate the flow of treated water in the tank

(1~2 L/分)した。空気上昇により流入側の仕切りには上向流、排水側の仕切りには下降流が生まれる構造にした。排水側の仕切りには6 cmのステンレス製の支持棒を、底面と水平に上方と下方に平行に2本設置し、この支持棒に揺動床担体（バイオフィリンジ）を設置した。このバイオフィリンジは、既往の研究でアンモニア酸化菌の亜硝酸化に使用されており^{14), 15)}、底泥試料からアンモニア酸化菌および亜硝酸酸化菌を集積するのに適していると考えられた。

この揺動床連続処理槽に、堺調整池、あるいは泉大津調整池の底泥試料を、それぞれの処理槽に1 L入れ、Lieuら（2005）¹⁶⁾の組成を参考にして調製した合成浸出水（Table 3）を4.4 L入れ総量で5.4 Lとし、処理槽内は投げ込み式のヒーターにより25℃に加温・調整した。

この処理槽に、バリスタポンプを用いて2 mL/分の速さでそれぞれの合成浸出水を連続的に流入させた。合成浸出水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は50 mg/L、pHは9.0で調整した。また、塩分濃度は、堺調整池と泉大津調整池のそれを想定して0.5%と3.0%となるよう塩化ナトリウムを添加した。さらに、それぞれの塩分濃度を入れ替えた処理系も設置した。すなわち、試験区として、堺調整池の底泥に塩分濃度0.5%の合成浸出水を流入させた区（S-0.5区）、3.0%の合成浸出水を流入させた区（S-3.0区）、泉大津

Table 3 Component of the artificial leachate

Ingredient	Concentration (mg/L (Tap water))			
	S-0.5	S-3.0	I-0.5	I-3.0
$\text{NH}_4\text{Cl} (\text{NH}_4\text{-N})$			50	
KH_2PO_4			43.4	
NaHCO_3			530	
KHCO_3			630	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			328	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			235.2	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			16	
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$			16	
NaCl	5,000	30,000	5,000	30,000
pH			9.0	

調整池の底泥に塩分濃度0.5%の合成浸出水を流入させた区（I-0.5区）、3.0%の合成浸出水を流入させた区（I-3.0区）の合計4系の処理区を構築した。なお、処理槽から排出され、メスシリンダーに沈降した底泥は、1~2日に1回の頻度で処理槽に返送した。処理期間は、S-0.5区とI-3.0区では2012年1月16日~2012年7月30日、S-3.0区とI-0.5区では2012年12月5日~2013年4月3日とした。

2.3 処理水の水質測定

流入水および処理水の測定項目は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度、全溶存態窒素濃度（TDN）とした。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の測定は、Rhine法¹⁷⁾で、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度と $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度はイオンクロマトグラフ（ICS1100に陰イオン分離カラムAS23を装着：Dionex）で測定した。流入水と処理水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度あるいは $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の差からアンモニア態窒素摂取速度（AUR：Ammonium Uptake Rate）および硝酸態窒素生産速度（NAPR：Nitrate Production Rate）を求めた^{18), 19)}。

2.4 汚泥中のAOBおよびNOB

処理試験終了時に揺動床に付着した汚泥を採取し、菌叢解析に供した。汚泥（約1.0 g）からISOIL（ニッポンジーン）によりDNAを抽出・精製した。これらDNAを鋳型として16S rRNA遺伝子の増幅を行った。増幅には、16S 6Fと1492Rのプライマーセットを用いた^{20), 21)}。PCR条件は95℃にて熱変性を120秒間行った後、95℃（45秒）→50℃（45秒）→72℃（90秒）の増幅プログラムを30サイクル行った。PCR後、1%アガロースゲルで電気泳動（100 V、20分）を行いPCRにより目的遺伝子領域が増幅

されたことを確認した。

得られたPCR産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。これを制限酵素 EcoRV で処理したプラスミドベクター pBluescript II KS + (Stratagene) とライゲーションし、このプラスミドベクターで大腸菌 DH5a を形質転換し、16S rRNA 遺伝子をクローニングした。

クローニングした16S rRNA 遺伝子の塩基配列は BigDye terminator ver3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) と Genetic analyzer 3130xl (Applied Biosystems) を用いて決定した。決定した16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、相同性検索アルゴリズム (NCBI-BLAST) を用い、GenBank に登録されている塩基配列を対象として相同性検索を行った。

3. 結果

3.1 各態窒素濃度の推移

S-0.5区およびS-3.0区における $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は、実験開始0日目はそれぞれ48.3 mg/L および39.8 mg/L であったが、処理当初から速やかに低下し10日程度で1.0 mg/L

以下まで低下し、その後は定量下限値 (0.1 mg/L) 以下～1.0 mg/L の低濃度で推移した (Fig. 4(a)(b))。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度は、実験開始0日目はほとんど検出されなかったが、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の低下に伴い上昇し10日程度で処理水中の窒素のほとんどが $\text{NO}_2\text{-N}$ となった。その後50 mg/L と同程度で推移したが、S-0.5区では22日目から、S-3.0区では35日目から速やかに低下し、以降は概ね定量下限値 (0.1 mg/L) 以下～1.0 mg/L の低濃度で推移した。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は、実験開始0日目から1.0 mg/L 程度の低濃度で推移したが、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の低下に伴い上昇し、S-0.5区では24日目に55.0 mg/L、S-3.0区では43日目に54.3 mg/L となり、その後も合成浸出水の窒素源濃度の50 mg/L と同程度で推移し、完全硝化が確認された。

I-0.5区における $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は、実験開始0日目は37.7 mg/L であったが、処理当初から速やかに低下し、10日目以降は定量下限値 (0.1 mg/L) 以下の低濃度で推移した (Fig. 4(c))。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度は、処理当初は確認されなかったが、5日目から低濃度で確認され、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の低下に伴い上昇し、12日目～18日目は流入した合成浸出水の窒素源濃度の50 mg/L と同程度で推移した。21日目から速やかに低下しその後は低濃度で推移した。 $\text{NO}_3\text{-N}$

Fig. 4 Changes in concentrations of nitrogen in S-0.5 (a), S-3.0 (b), I-0.5 (c), and I-3.0(d) reactors during the experimental periods. Symbols: □, $\text{NH}_4\text{-N}$; ▲, $\text{NO}_2\text{-N}$; ×, $\text{NO}_3\text{-N}$

濃度は、実験開始0日目から18日目まで1.0 mg/L程度の低濃度で推移したが、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の低下に伴い上昇し、23日目には45.9 mg/Lとなった。

I-3.0区における $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は、実験開始0日目には40.7 mg/Lであったが、処理当初から徐々に低下し、14日目以降は定量下限値 (0.1 mg/L) 以下～1.0 mg/Lの低濃度で推移した (Fig. 4(d))。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度は、実験開始0日目からほとんど検出されなかったが、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の低下に伴い上昇し14日目には34.6 mg/Lとなり、処理水中の窒素のほとんどが $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度となった。その後は、18日目～88日目の長期間、流入した合成浸出水の窒素源濃度の50 mg/L同程度で推移した。91日目から徐々に低下し116日目に8.5 mg/Lとなった以降は変動しながらも低下し続け、150日目以降は概ね定量下限値 (0.1 mg/L) 以下～1.0 mg/Lの低濃度で推移した。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は、実験開始0日目に1.0 mg/L程度で88日目まで推移したが、91日目以降は $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度の低下に伴い変動しながら徐々に上昇し、150日目以降は流入水と同程度で推移した。

3.2 AURとNAPRの推移

S-0.5区のAURは試験開始4日目には0.26 mgN/L/hr

であったが、速やかに増加し、試験開始13日目には0.98 mgN/L/hrとなり、その後は同程度で推移した (Fig. 5(a))。一方でNAPRは、試験開始13日目までは0.02 mgN/L/hrと低かったが、試験開始25日後には増加して1.01 mgN/L/hrとAURを上回り、50日目には1.20 mgN/L/hrとなった。試験開始50日目以降は196日目まで暫減傾向を示し、114日目以降はAURを下回った。

S-3.0区のAURは試験開始0日目には0.09 mgN/L/hrであり、速やかに増加し、試験開始42日目には0.84 mgN/L/hrとなり、その後は同程度で推移した (Fig. 5(b))。一方でNAPRは、試験開始30日目までは0.02～0.05 mgN/L/hrと低い値で推移したが、試験開始35日目以降から増加し42日目には1.05 mgN/L/hrとAURを上回った。試験開始42日目以降暫減傾向を示し、79日目以降はAURを下回った。

I-0.5区のAURは試験開始0日目には0.15 mgN/L/hrであったが、すみやかに増加し、試験開始8日目には0.84 mgN/L/hrとなり、その後は同程度で推移した (Fig. 5(c))。一方でNAPRは、試験開始16日目までは0.02～0.03 mgN/L/hrと低い値で推移したが、試験開始21日目以降から増加し23日目には0.89 mgN/L/hrとAURを上回っ

Fig. 5 Changes in the ammonia uptake rates (AUR) and the nitrate production rates (NAPR) in S-0.5 (a), S-3.0 (b), I-0.5 (c), and I-3.0(d) reactors during the experimental periods. Symbols: $\square$, AUR; $\blacktriangle$, NAPR

た。試験開始42日目には1.03 mgN/L/hrとなったが、それ以降暫減傾向を示し、107日目以降はAURを下回った。

I-3.0区のAURは試験開始4日目には0.33 mgN/L/hrであったが、徐々に増加し、試験開始25日目には0.93 mgN/L/hrとなり、その後は同程度で推移した (Fig. 5 (d))。一方でNAPRは、試験開始91日までは0.1 mgN/L/hr以下の低い値で推移した。その後緩やかに増加し試験開始147日後にようやく0.82 mgN/L/hrとなり、それ以降は暫減傾向を示した。I-3.0区では試験期間中を通じてNAPRはAURを下回った。

3.3 処理槽のAOBとNOB

連続処理終了後の処理槽汚泥中の菌叢解析結果をTable 4に示す。

S-0.5区では、総数36クローンのうち淡水性AOBの*Nitrosomonas nitrosa*近縁種が7クローン検出された。また、海水性NOBの*Nitrospira marina*近縁種が5クローン検出された。

S-3.0区からは、総数43クローンのうち海洋性AOBの*Nitrosomonas marina*近縁種が1クローン検出されたが、S-0.5区で検出された淡水性AOBの*Nitrosomonas nitrosa*近縁種は検出されなかった。また、海洋性NOBの*Nitrospira marina*近縁種が4クローン、別の*Nitrospira* sp.が1クローン検出された。

I-0.5区からは、総数42クローンのうち海洋性AOBの*Nitrosomonas halophila*近縁種が7クローン検出された。また、海水性NOBの*Nitrospira marina*近縁種が5クローン検出された。

I-3.0区からは、総数35クローンのうちI-0.5区と同様に海洋性AOBの*Nitrosomonas halophila*近縁種が13クローン検出された。さらに、海洋性NOBの*Nitrospira*

*marina*近縁種も1クローン検出された。また、この試料中からは未培養の細菌CCSD_DF2030_B11近縁種が7クローンと比較的多く検出された。 $\text{NH}_4\text{-N}$ を含む合成浸出水で連続処理している試料から検出されたクローンであり、窒素循環に関与する可能性があるが、塩基配列だけではAOBやNOBであるか否かはわからなかった。さらに、汽水性のアンモニア酸化古細菌の1種である*Candidatus Nitrosoarchaeum limnia* BG20 clone bBG20-50近縁種²²⁾が1クローン検出された。

4. 考察

揺動床連続処理装置を用いた硝化試験において4つの試験区全てで、処理開始当初から速やかにアンモニア酸化が起こることが確認された (Fig. 4)。これらの結果から、調整池底泥のAOBは3%までの塩分濃度であれば、塩分濃度と関係なく酸素供給により比較的速やかに $\text{NH}_4\text{-N}$ を $\text{NO}_2\text{-N}$ まで酸化出来ることが明らかになった。しかしながら、調整池の水中には $\text{NH}_4\text{-N}$ で残留していた (Table 1, 2)。堺調整池の浸出水流入付近では低濃度であるものの溶存酸素は残存していたことから (Table 1)、底泥と浸出水との接触が不十分であり、アンモニア酸化が制限されたと推察された。一方で、泉大津調整池では調整池の溶存酸素濃度は極めて低く、供給された酸素は速やかに消費され、酸素不足によりアンモニア酸化が制限されたと推察された (Table 2)。さらに泉大津調整池では、表層から底層まで酸化還元電位が-400 mV程度と低く、空気と接する表層のごく薄い層でアンモニア酸化が起こると推察された。

亜酸化化までに要した期間、すなわち、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が検出されるまでに要した期間は、S-0.5区、S-3.0区、I-

Table 4 Detection frequencies and closest relatives of AOB and NOB-like in the reactors.

Description	Accession	S-0.5		S-3.0		I-0.5		I-3.0	
		Identity (%)	Clone	Identity (%)	Clone	Identity (%)	Clone	Identity (%)	Clone
<i>Nitrospira marina</i>	X82559.1	99	5	99	4	99	5	93	1
<i>Nitrospira</i> sp.	Y14644.1	—	—	98	1	—	—	—	—
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	FR828477.1	100	7	—	—	—	—	—	—
<i>Nitrosomonas marina</i>	AF272418.1	—	—	97	1	—	—	—	—
<i>Nitrosomonas halophila</i>	AY026317.1	—	—	—	—	—	—	99	13
<i>Nitrosomonas halophila</i>	AF272413.1	—	—	—	—	99	7	—	—
Uncultured bacterium clone CCSD_DF2030_B11	AY820706.1	—	—	—	—	—	—	99	7
Total			36		43		42		35

0.5区、およびI-3.0区で、それぞれ19日、35日、21日、および91日となり、S-0.5区およびI-0.5区と比較してS-3.0区およびI-3.0区で長かった。これらのことから、調整池底泥の亜硝酸酸化についても多くの既往の研究の定説^{6)~8)}と同様に、塩分濃度が高い条件では亜硝酸酸化が阻害されることが明らかになったが、すべての処理区において最終的には亜硝酸酸化まで起こることから、塩分による阻害は期間の長短はあるが一次的作用であり、培養条件によって阻害が起こらなくなるとする阿部らの報告¹³⁾とも一致することとなった。

なお、著者らのこれまでの研究で、堺調整池あるいは泉大津調整池の底泥を円筒の容器に入れて水相を攪拌しながら、本研究と同じ0.5%あるいは3.0%の塩分を含む合成浸出水で連続処理した試験をしている。この試験でも、堺調整池の底泥を入れて0.5%の塩分を含む合成浸出水で処理した試験区では速やかに亜硝酸酸化が起こったのに対し、泉大津調整池の汚泥を入れて3.0%の塩分を含む合成浸出水で処理した試験区では亜硝酸酸化までに要した期間は100日程度とI-3.0区と同様の結果を得ており、これらの結果も堺調整池あるいは泉大津調整池の窒素循環に対する考察を裏付けている（相子：未発表）。

堺調整池の亜硝酸酸化に関与するNOBは、海洋性の*Nitrospira marina*近縁種であり、塩分を高めるとその他の*Nitrospira*属の細菌も検出された。泉大津調整池の亜硝酸酸化に関与するNOBは、塩分濃度にかかわらず海洋性の*Nitrospira marina*近縁種が検出されたが、検出されたクローン数は少なくその他の細菌も亜硝酸酸化に関与していることも考えられた。

揺動床連続処理装置を用いた硝化試験の4つの試験区全てで、AURは処理開始当初から速やかに増加し、一定の値で安定した（Fig. 5）。アンモニア酸化が速やかに起こり、 $\text{NH}_4\text{-N}$ のほとんどすべてが酸化されたことを示した。

NAPRはI-3.0区を除く3つの試験区では、一時的にAURを上回るまで増加した（Fig. 5）。これらの3試験区では試験初期には底泥から窒素が溶出し、この窒素が $\text{NO}_3\text{-N}$ まで酸化されたことが考えられた。さらに、時間の経過とともに徐々に低下し、NAPRはすべての試験区でAURより低い値を示した。これらの試験区では、有機物を含まない合成浸出水を連続的に処理したことから、担体上には独立栄養性の脱窒を行う細菌が集積され、生産された $\text{NO}_2\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ の一部が独立栄養的な脱窒反応により除去されたことが考えられた。調整池底層の溶存有機炭素（DOC）は、堺調整池で19.8 mg/L、泉大津調整池

で12.6~20.6 mg/Lと低く（Table 1, 2）、1ヶ月程度の滞留の間に易分解性分は分解されていると考えられるため従属栄養的な脱窒は起こりにくく、どちらの調整池でも独立栄養的な脱窒反応が起こっていることが十分に考えられた。また、著者らの関連する研究成果として、底泥にアナモックス菌が存在することや底泥の直上水を好氣的に維持することによりアナモックス活性の促進することなど、底泥におけるアナモックス反応の可能性が報告されており、本研究結果における独立栄養的な脱窒反応の可能性を支持している²³⁾。

5. まとめ

両調整池の汚泥を用いた揺動床連続処理装置での硝化試験で、堺調整池および泉大津調整池の底泥では、3%までの塩分濃度であれば、塩分濃度と関係なく酸素供給により速やかにアンモニア酸化が起こることが確認された。しかしながら、塩分濃度が高い条件では亜硝酸酸化が阻害され、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が残留しやすいことが明らかになった。これらのモデル実験の結果から、堺調整池ではアンモニア酸化により生成された $\text{NO}_2\text{-N}$ は $\text{NO}_3\text{-N}$ まで酸化されるのに対し、泉大津処分場では $\text{NO}_2\text{-N}$ で留まることが推察された。ただし、どちらの調整池現地でも $\text{NO}_2\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ が検出されていないことから、堺調整池では $\text{NO}_3\text{-N}$ から、泉大津調整池は $\text{NO}_2\text{-N}$ から始まる脱窒が滞留期間中に起こっていることが推察された。

調整池の窒素循環には、酸素供給量や有機炭素溶存量、微生物叢などが関与している。これらの関わりを明らかにすることにより、調整池の自浄作用を効率的に活用し、埋立処分場浸出水の窒素濃度管理を低コスト化することが可能になると考えている。

謝辞

本研究の試料採取には、堺第7-3区管理事務所および大阪湾広域臨海環境整備センター泉大津事務所の協力を得て実施した。また、本研究の一部は廃棄物・海域水環境保全に係る調査研究費助成制度の支援を受けて実施した。ここに記して謝意を表す。

引用文献

- 1) 遠藤和人：廃棄物海面最終処分場の役割と位置付け、国立環境研究所ニュース、28(2)、8-10（2009）
- 2) 環境省：一般廃棄物の最終処分場及び産業廃棄物の最終処分場に係る技術上の基準を定める省令（改正：平成10年6月10日公布、総理府・厚生省令第2号）

- 3) 福井博・横山尚秀：最終処分場浸出液の水質の経時変化, 全国環境研究会誌29(3), 162-166 (2004)
- 4) 橋本宗明・東原 純・野並 賢：海面処分場の現状と将来性 海面処分場の事例その2 大阪湾フェニックスの例について, 地盤工学会誌, 61-8(667), 73-80 (2013)
- 5) 大阪府循環型社会推進室：堺第7-3区産業廃棄物最終処分場排水処理効率化検討委員会報告書 (2013)
- 6) Yu, D.-S., Peng, Y.-Z. and Zhang, K.: Effects of seawater salinity on nitrite accumulation in short-range nitrification to nitrite as end product, *J. Environ. Sci.*, 16(2), 247-251 (2004)
- 7) Cui, Y.W., Peng, Y.Z., Peng, C.Y., Gan, X.Q. and Ye, L.: Achieving biological nitrogen removal via nitrite by salt inhibition, *Water Sci. Technol.*, 53(6), 115-122 (2006)
- 8) Zhang, Y., Chen, L., Dai, T., Tian, J. and Wen, D.: The influence of salinity on the abundance, transcriptional activity, and diversity of AOA and AOB in an estuarine sediment: a microcosm study
- 9) Campos, J.L., Mosquera-Conal, A., Sánchez, M., Méndez, R. and Lema, J.M.: Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit, *Water Res.*, 36(10), 2555-2560 (2002)
- 10) Hunik, J.H., Meijer, H.J.G. and Tramper, J.: Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at extreme substrate product and salt concentration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37(6), 802-807 (1992)
- 11) Hunik, J.H., Meijer, H.J. G., Tramper, J.: Kinetics of *Nitrobacter agilis* at extreme substrate product and salt concentration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40(2-3), 442-448 (1993)
- 12) Sánchez, O., Aspe, E., Marti, M.C. and Roeckel, M.: The effect of sodium chloride on the two-step kinetics of the nitrifying process, *Water Environ. Res.*, 76(1), 73-80 (2004)
- 13) 阿部憲一・大橋晶良・山口隆司・徳富孝明：塩分濃度による亜硝酸型硝化の誘導効果の有無, 環境工学研究論文集, 44, 195-200 (2007)
- 14) Zhang, L., Yang, J., and Furukawa, K.: Stable and high-rate nitrogen removal From reject water by partial nitrification and subsequent anammox, *J. Biosci. Bioeng.*, 110(4), 441-448 (2010)
- 15) Qiao, S., Kawakubo, Y., Koyama, T., and Furukawa, K.: Partial nitrification of raw anaerobic sludge digester liquor by swim-bed and swim-bed activated sludge processes and comparison of their sludge characteristics, *J. Biosci. Bioeng.*, 106(5), 433-441 (2008)
- 16) Lieu, P. K., Hatozaki, R., Homan, H., and Furukawa, K.: Single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitrification (SNAP) for treatment of synthetic landfill leachate, *Jpn. J. Water Treat. Biol.*, 41(2), 103-112 (2005)
- 17) Rhine, E.D., Mulvaney, R.L., Pratt, E.J., and Sims, G.K.: Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water, *Soil Science Society of America*, 62(2), 473-480 (1998)
- 18) Dytczak, M.A., Londry, K.L., Oleszkiewicz, J.A.: Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates, *Water Res.*, 42, 2320-2328 (2008)
- 19) Dytczak, M.A., Londry, K.L., Siegrist, H., Oleszkiewicz, J.A.: Ozonation reduces sludge production and improves denitrification. *Water Res.*, 41, 543-550 (2007)
- 20) Normand P., Cournoyer B., Nazaret S., Simonet P.: Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*, *Gene*, 111, 119-124 (1992)
- 21) Lane, D.J.: 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M., editors.: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons. pp.115-175 (1991)
- 22) Mosier, A.C., Allen, E.E., Kim, M., Ferriera, S. and Francis, C.A.: Genome sequence of "*Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*" BG20, a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon from the San Francisco Bay estuary, *J. Bacteriol.*, 194(8), 2119-2120 (2012)
- 23) Aiko, N., Yabuki, Y., Hira, D., Nakamura, T., and Suwa, Y.: Effect of nitrate addition on anammox activities in sediment from the bottom of leachate adjustment reservoir of controlled final landfill Site, *Proceeding of International Anammox Symposium (IANAS2015)* 128-129 (2015)

(受付 2017. 4 . 3)

(受理 2017. 9 . 28)