

膜分離技術を導入したアナモックス処理法による富栄養化防止技術

広島大学 大学院工学研究院 金田一 智規

1. はじめに

閉鎖性水域の富栄養化防止の観点から、廃水中の栄養塩（窒素・リン）の削減が求められている。このうち、窒素除去を行うプロセスとしては、活性汚泥法をベースとした排水処理技術のひとつである硝化・脱窒プロセスが多く用いられているが、これに代わる次世代型の生物学的窒素除去プロセスとしてアナモックス処理法が近年注目を集めている。アナモックスプロセスは、亜硝酸性窒素（ NO_2^- ）を電子受容体としてアンモニア性窒素（ NH_4^+ ）を嫌氣的に酸化する微生物学的プロセス（ $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 \uparrow + 2\text{H}_2\text{O}$ ）である。アナモックスプロセスは、従来の硝化・脱窒プロセスと比較して、酸素曝気にかかるエネルギーが最大 62%削減、外部炭素源が 100%削減、余剰汚泥発生量は 70%が削減可能である。このようなメリットがある一方で、反応を担うアナモックス細菌の増殖速度は極めて遅く、実用化に向けたリアクターの開発が可能な段階にきているが、普及が進んでいないのが現状である。

アナモックスプロセスを実排水に適用する上で解決すべき課題は 2 つがあげられる。第一に、廃水中のほとんどの窒素はアンモニア態として存在しているため、アナモックス細菌が利用できるようにアンモニアの一部を亜硝酸に酸化する亜硝酸型硝化プロセスが不可欠である。亜硝酸型硝化を達成するためには、現状では溶存酸素濃度、温度、塩分、遊離アンモニア濃度などを制御してアンモニア酸化細菌のみを優占化させる環境づくりを行っているが、排水中に含まれるアンモニア濃度が低濃度の場合には難しい。しかしながら、海洋性のアナモックス細菌は亜硝酸酸化細菌と比較しても亜硝酸に対する基質親和性が高く、この両者の基質親和性の差をうまく利用すれば、亜硝酸酸化細菌よりも海洋性アナモックス細菌のみを系内に優占化されることができ、低濃度アンモニア含有廃水にも適用が可能である。第二に、海洋性のアナモックス細菌の増殖速度（最大の倍化時間は 14 日）は淡水性のアナモックス細菌の増殖速度の約半分であり、十分な菌体量の確保に多大な時間を要する。一方で、窒素除去速度は淡水性のアナモックス細菌のものと比較しても同程度であることから、十分な菌体量の確保さえ出来れば高い窒素除去性能を発揮できる。さらに、一度十分な菌体量を確保すれば、増殖速度の遅さは余剰汚泥発生量の減少にもつながると考えられる。

これらの課題を一度に解決する方法として、膜分離技術を導入することがあげられる。膜分離技術を導入したメンブレンバイオリアクター（MBR）を用いると、増殖した菌体を槽内に完全保持でき、スタートアップ期間短縮、槽内の完全混合が可能となる。菌

体の完全保持によって、アナモックス活性の低下を菌体数でカバーすることが可能となり、アナモックスプロセスで必要不可欠な加温（37℃が最適）が不要となり、コスト削減につながると考えられる。さらに、完全混合によって槽内の各態窒素濃度を低濃度に保つことができ、アナモックス細菌に対する高濃度亜硝酸阻害を防ぐことが出来る。また、槽内の亜硝酸濃度を低く保つことで、特に基質親和性が高い海洋性アナモックス細菌のみを優占化させることができ、亜硝酸酸化細菌の増殖を抑制することが出来る。これにより、一槽型の亜硝酸型硝化-アナモックスプロセスが達成できると考えられる。

以上のことから本研究の目的は、以下に示す通り大きく分けて4つある。

- (1)淡水性アナモックス細菌を用いたアナモックス MBR の長期安定性の評価
- (2)淡水性/海洋性アナモックス細菌を用いた低温環境化でのアナモックス活性の評価
- (3)海洋性アナモックス細菌を用いた低塩分濃度での活性評価
- (4)海洋性アナモックス細菌を用いた部分硝化-アナモックスプロセスの一槽型化

2. 実験方法

2.1 概説

上記の目的(1)及び(2)の検証を行うために、淡水性アナモックス細菌を植種した MBR の実験系を立ち上げた。運転初期には至適温度付近の 35℃にて培養を行い、目的(1)についての結果を得ることとした。その後、培養温度を次第に 15℃まで低温化していくことで、目的(2)について検証を行った。目的(3)については、海洋性アナモックス細菌を植種した MBR を用い、基質中の塩分濃度を運転初期の 2.0%から 0.5%ずつ段階的に下げて、窒素除去速度を指標としてアナモックス活性の変化を追った。目的(4)では、目的(3)で用いたリアクターとは別に海洋性アナモックス細菌を植種した MBR を立ち上げ、アナモックス反応による安定した窒素除去を確認後、リアクターへの酸素供給を行って運転条件を探りながら、好氣的アンモニア酸化反応とアナモックス反応が同時に起こる一槽型の窒素除去プロセスの構築を目指した。

2.2 淡水性アナモックス MBR の運転—目的(1)(2)

本実験では、図 2.1 に示すようなリアクターを運転した。リアクターに設置した膜はポリエチレン製の中空糸膜（三菱レイヨン社製）であり、膜孔径 0.03 μm 、膜面積 0.18 m^2 のものを使用した。膜透過フラックスは、先行研究結果からファウリングが進行しにくい 0.05 m/day を採用し¹、リアクターの流量は 9.0 L/day とした。リアクターの有効容積は 640 mL 、水理的滞留時間（HRT）は 1.84 h であった。基質には人工無機培地を使用した。基質作成時、pH は 6.5-7.5 となるように調整を行った。リアクタ

一の初期運転温度は 35°C とした。窒素除去速度が安定し目的(1)の実験を終了後、1 日に 4°C ずつ、5 日間で 15°C まで徐々に温度を下げた。植種源は、up-flow 型のアナモックスリアクター内のグラニュール汚泥を用いた。槽内で発生した窒素ガスを循環し、気泡による膜表面の物理洗浄を行うとともに槽内を混合状態に保った。

各態窒素濃度の測定にはイオンクロマトグラフィーを用い、リアクター通水前後の各態窒素濃度から窒素除去率及び窒素除去速度を算出した。また膜の透過性能を維持するため、約 1 ヶ月おきに MBR から膜を取り出し、スポンジを用いて膜表面に付着した菌体や堆積物を拭き取った後、1%次亜塩素酸ナトリウム(pH=10) で薬品洗浄を行った。薬品洗浄を終えた膜は純水で内部を置換した後にリアクターへ戻し、運転を再開した。

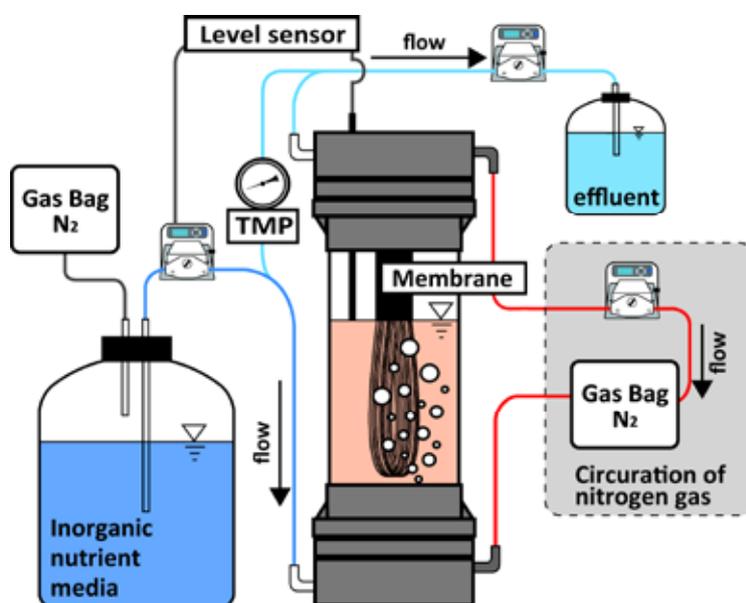


図 2.1 アナモックス MBR (概略図)

2.3 海洋性アナモックス MBR の低塩分濃度での運転—目的(3)

本実験では、図 2.1 と同様のシステムのアナモックス MBR を用いた。なお、植種源は up-flow 型のアナモックスリアクター内の海洋性アナモックス細菌のグラニュール汚泥とした。リアクターに取り付けた膜は、ポリエチレン製の中空糸膜 (三菱レイヨン社製) であり、膜孔径 0.03 μm 、膜面積 0.072 m^2 である。膜透過フラックスは、膜ファウリングが進行しにくい 0.05 m/day を採用し、これより流量は 3.6 L/day と決定した。リアクターの有効容積は 250 mL 、水理的滞留時間 (HRT) は 7.5 h であった。基質には人工の無機培地を使用し、流入アンモニア濃度は 50 $\text{mg-N}/\text{L}$ とした。基質作成時には人工海水のもとを用いて塩分濃度 2.0%の模擬海水を作成し、窒素パージ後に

pH が 6.5-7.5 となるように調整を行った。リアクターの運転温度は 28°C とした。塩分濃度 2.0% における安定的な窒素除去を確認後、窒素除去性能の経時変化を観察しながら 0.5% ずつ塩分濃度を下げて運転を行った。槽内で発生した窒素ガスを循環し、気泡による膜表面の物理洗浄を行うとともに槽内を混合状態に保った。

各態窒素濃度の測定にはイオンクロマトグラフィーを用い、リアクター通水前後の各態窒素濃度から窒素除去率及び窒素除去速度を算出した。膜の透過性能を維持するための膜洗浄は 2.2 に記載した方法と同様に行った。

2.4 海洋性アナモックス MBR の一槽型化—目的(4)

本実験では、図 2.2 に示すようなリアクターを運転した。リアクターに取り付けた膜はポリエチレン製の中空糸膜（三菱レイヨン社製）であり、膜孔径 0.03 μm 、膜面積 0.18 m^2 である。膜透過フラックスは、ファウリングが進行しにくい 0.05 m/day を採用し、流量は 9.0 L/day とした。リアクターの有効容積は 640 mL 、水理学的滞留時間 (HRT) は 1.84 h であった。基質には人工の無機培地を使用し、流入アンモニア濃度は 50 $\text{mg}\text{-N}/\text{L}$ とした。基質作成時には人工海水のもとを用いて塩分濃度 3.0% の模擬海水を作成し、窒素パージ後に pH が 6.5-7.5 となるように調整を行った。リアクターの運転温度は 28°C とした。植種源には up-flow 型のアナモックスリアクター内の海洋性アナモックス細菌のグラニュール汚泥を 1.2 $\text{g}\text{-wet}$ 用いた。運転初期はリアクターに酸素供給を行わず、プレ培養として基質に亜硝酸を加えて海洋性アナモックス MBR として 100 日間運転した。一槽型化の際には、追加的なバイオマス植種はせずに酸素供給を開始し、バイオマス中にわずかに存在する好気性アンモニア酸化細菌の増殖を促すこととした。運転中は槽内で発生した窒素ガス及び空気供給ラインより供給される空気の混合ガスを回収し、ポンプで循環させて反応槽底部から噴出させることで槽内を混合状態に保った。

各態窒素濃度の測定にはイオンクロマトグラフィーを用い、リアクター通水前後の各態窒素濃度から窒素除去率及び窒素除去速度を算出した。また、槽内で消費された全窒素をアナモックス反応で生じた N_2 ガスと仮定し、Lotti ら (2014) により提案されたアナモックスの化学量論比 ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{NO}_3^- = 1:1.146:0.161$)² と亜硝酸化及び硝酸化の量論比 ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^- = 1:1$ 及び $\text{NO}_2^-:\text{NO}_3^- = 1:1$)、リアクター通水前後の各態窒素濃度をもとにして、好気性のアンモニア酸化細菌とアナモックス細菌のアンモニア酸化への寄与割合を計算した。膜の透過性能を維持するための膜洗浄は 2.2 に記載した方法と同様に行った。運転期間中、運転条件を変更する度にバイオマスを採取し、顕微鏡観察や遺伝子系統解析を行って菌相の変化を観察した。

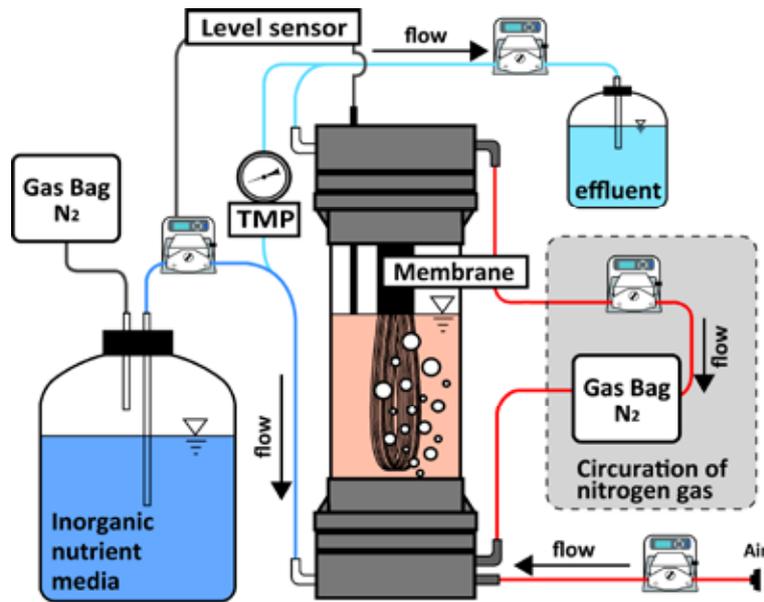


図 2.2 一槽型部分硝化-アナモックス MBR (概略図)

3. 結果と考察

3.1 アナモックスメンブレンリアクターの構築

本テーマでは、淡水性のアナモックス細菌とメンブレンリアクターを組み合わせることで、増殖速度の遅いアナモックス細菌の欠点を補完し、スタートアップ期間の短縮や効率的な窒素除去プロセスの確立を目指した。図 3.1 に、本実験に用いたリアクターの窒素負荷及び窒素除去速度を示す。本実験系は運転 1 日目から高い窒素除去性能を発揮し、非常にはやい立ち上がりを見せた。次第にアンモニア負荷、亜硝酸負荷をあげていき、運転 28 日目には窒素負荷 $8.50 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ において最大窒素除去速度 $6.71 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ を達成した。このときの流入アンモニア及び亜硝酸濃度は、それぞれ 260 及び 340 mg-N/L であった。短期間でこのように高い窒素除去性能を発揮したのは、アナモックス細菌のバイオマスをリアクター槽内に完全保持できる膜分離システムにより、槽内を完全混合状態に維持できたためである。槽内を完全混合状態に維持することで、槽内基質濃度を流入基質濃度よりも低濃度に維持することが可能となり、アナモックス細菌が高濃度基質阻害の影響を受けずに高負荷運転を行うことができたと考えられる。これは、槽内で基質の濃度勾配が生じない MBR ならではの利点であり、アナモックスリアクター立ち上げ時に適したシステムであるといえる。また、 35°C での 28 日間の運転期間中の平均窒素除去率は、アンモニア及び亜硝酸でそれぞれ 91.6 及び 89.3% であり、運転期間を通して安定的に高い窒素除去能を有していたことがわかる。

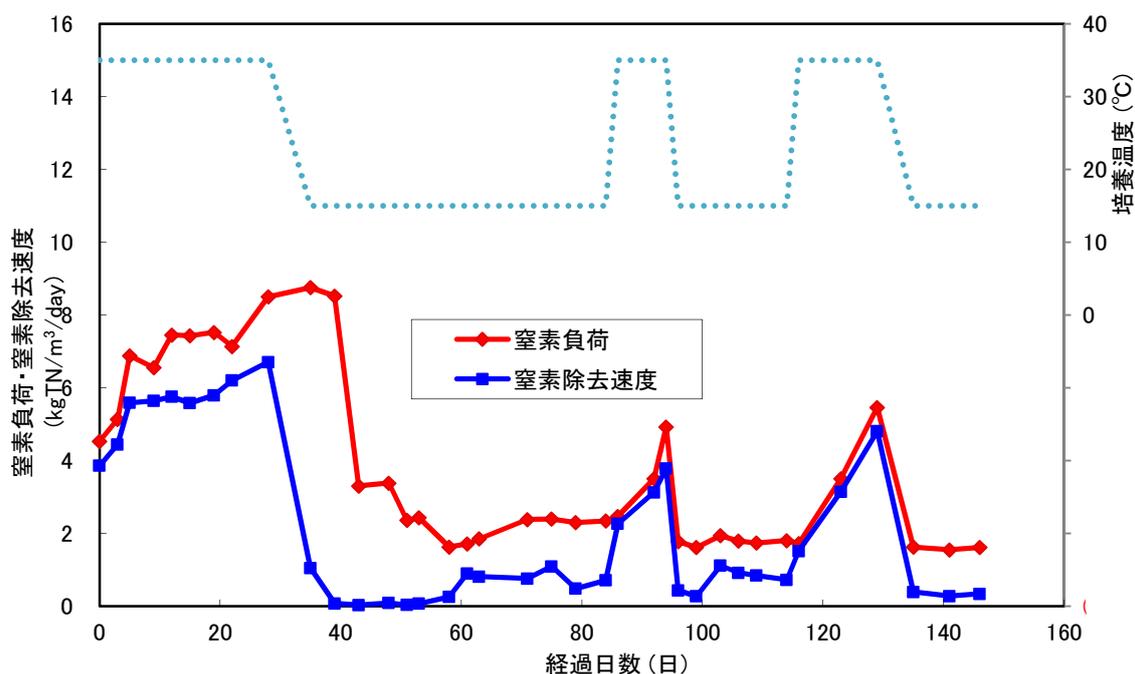


図 3.1 淡水性アナモックス MBR の窒素除去性能

3.2 低温環境下でのアナモックス活性の検討

本テーマでは、淡水性のアナモックス細菌を用いて、至適温度付近の 35°C と下水の年平均温度に近い 15°C の環境で交互に培養を行って、温度変化によるアナモックス活性への影響を調査した。3.1 での実験系を引き継ぎ、運転 29 日目から 5 日間かけて 35°C から 15°C まで培養温度を低下させ、低温化実験を開始した。図 3.1 より、培養温度 15°C に移行してから 2 日後の運転 35 日目には窒素除去がほとんど行われなくなったことがわかる。この原因として、菌体の活性が温度変化の影響で大幅に低下し、一方で流入窒素負荷は高いままで運転を続けたために槽内に亜硝酸が蓄積し、亜硝酸阻害を引き起こしたことが考えられた。そこで、窒素負荷を徐々に低下させて運転を続けていくと、アンモニア 50 mg-N/L、亜硝酸 66 mg-N/L (窒素負荷 1.64 kg-N/m³/day) の流入基質濃度において、僅かながらアンモニアと亜硝酸の同時除去が行われるようになった。このように活性低下時に処理する窒素濃度を把握した後、一旦培養温度を 35°C にあげるとすぐに高い窒素除去性能を発揮した。さらに、低温化時に同時に基質の窒素負荷を下げて運転を行うと、低温化後にもすぐにアナモックス反応が確認され、窒素除去率は 60% 程度では合ったが安定した窒素除去を行うことがわかった。以上のリアクター運転結果から、低温環境においては温度低下により亜硝酸が蓄積することが原因で亜硝酸阻害を引き起こし、菌体量を保持してもアナモックス活性は低下することが示された。15°C か

ら 35°Cへの温度推移に伴い、アナモックス活性がすぐに回復したことから、アナモックス細菌は低温環境へ馴致しないが、温度ショックからの回復は早いことが示された。また、運転 28 日目 (35°C) 及び 84 日目 (15°C) に菌体のサンプリングを行い、系統解析を行った。この結果から、低温化前後で菌相に変化はみられず同一種のアナモックス細菌で構成されており (図 3.2)、アナモックス細菌の構成比も変化しないことを確認した。

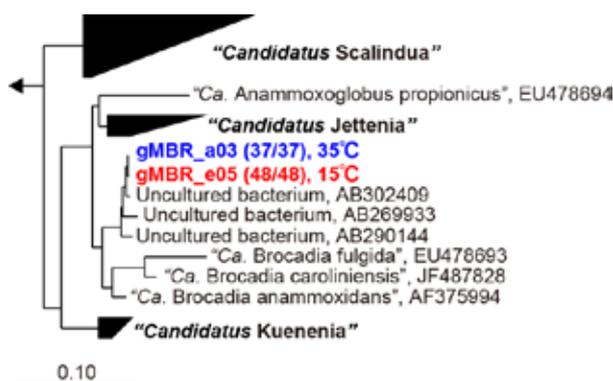


図 3.2 系統樹

3.3 低塩分濃度でのメンブレンバイオリアクターの運転

本テーマでは、海洋性アナモックス細菌が優占化するアナモックス MBR において菌体を槽内に完全保持した状態で、流入させる塩分濃度を段階的に減少させ、低濃度塩分域の窒素除去速度を評価した。初期は塩分濃度 2.0%で運転を行い、窒素除去性能の経時変化を観察しながら 0.5%ずつ段階的に濃度を下げて運転を行った。図 3.3 には、このときの窒素負荷・窒素除去速度のグラフ及び塩分濃度の推移を示す。この図より、2.0%から 1.5%、さらに 1.0%へ変化させても、窒素除去速度の影響は見られなかった。その後、1.0%から 0.5%へ塩分濃度を低下させたとき、アンモニアおよび亜硝酸の除去率がともに 10%以上落ち込み、窒素除去速度は 0.37 kg-N/m³/day 低下した。しかしながら、塩分濃度 0.5%のままで運転を続けると 10 日ほどで窒素除去性能が徐々に回復したことから、塩分濃度を低くしても海洋性アナモックス細菌群集は低塩分環境に適応することが示された。以上より、塩分濃度 0.5%までは馴致に 10 日ほど時間を要するもののオペレーションには影響しないことが確認された。塩分下限値を明らかとするためには、今後も塩分濃度を下げながら運転を続ける必要がある。また、0.5%の低塩分環境下では海洋性アナモックス細菌の活性が 1/5 程度に減少することが報告されている³ことから、低塩分環境下でアナモックス活性を示すのは優占化していた海洋性アナモックス細菌なのか別の細菌なのかを特定することは非常に興味深い。

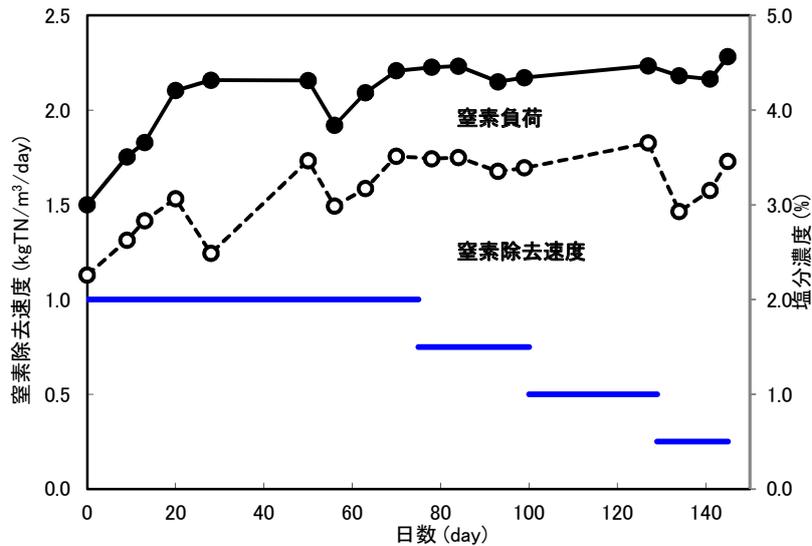


図 3.3 塩分濃度変化時の窒素負荷・窒素除去速度

3.4 一槽型メンブレンアナモックスリアクターの構築

このテーマでは、海洋性アナモックス細菌を植種したアナモックス MBR に酸素供給を行って、海洋性アナモックス細菌と好気性アンモニア酸化細菌の共生系で窒素除去を行うリアクターの構築を目指した。

3.4.1 酸素供給方法の検討

嫌気性 MBR として運転するリアクター槽内に酸素を供給する方法としては、基質の脱気をやめて溶存酸素 (約 8.0 mg-O₂/L) を供給する方法や、空気供給ラインを設置し酸素過多になりすぎないように空気供給する方法が考えられた。このうち、前者の方法では、亜硝酸化の化学量論比 (NH₄⁺: O₂ = 2:3) をもとに計算しても、酸素が不足してしまう結果となる。そこで、立ち上げ時には基質の溶存酸素を酸素源として供給し、反応が進んできた段階で供給ラインを追加することとした。

3.4.2 好气的アンモニア酸化細菌の植種源の検討

酸素供給開始時にはリアクター内に好気性アンモニア酸化細菌を優占化させることが必要であった。好気性アンモニア酸化細菌を優占化させるには、アナモックス細菌と共存している好気性アンモニア酸化細菌を増やす方法や、純菌を購入して加える方法、活性汚泥を植種する方法などが考えられた。好気性アンモニア酸化細菌の純粋培養系の植種は実排水に適用する場合は難しく、活性汚泥を植種すると所望の好気性アンモニア酸化細菌だけでなく増殖を抑制したい好気性亜硝酸酸化細菌など他の細菌まで槽内に

持ち込む可能性があった。そこで、槽内のアナモックス細菌と共存している好気性アンモニア酸化細菌の存在確認及び増殖速度の確認を目的として、好気環境でアナモックス細菌のバイオマス（アナモックスグラニュール）を1週間培養した。その結果、1週間経過後には亜硝酸とともに硝酸が生成されており、アンモニアの消費、亜硝酸及び硝酸の生成比を計算すると、 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^- : \text{NO}_3^- = 1.00 : 1.01 : 0.34$ であった。この反応は、好気環境下であるので、通常の硝化反応が起こっていると推察された。このことは蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）法による顕微鏡観察結果と一致し、好気性アンモニア酸化細菌の存在が確認された（表 3.1、図 3.4）。一方、嫌気状態で培養しているアナモックスバイオマスの顕微鏡観察では好気性アンモニア酸化細菌の存在は確認できなかったことから、酸素供給により増殖することが確認され、バイオマスの植種は行わずに酸素供給を開始することとした。

表 3.1 顕微鏡観察時に使用したプローブ

Probes	Sequence (5' to 3')	Specificity	Reference
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Most bacteria	Amann <i>et al.</i> (1990) ⁴
EUB338II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetales</i>	Daims <i>et al.</i> (1999) ⁵
EUB338III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	Daims <i>et al.</i> (1999) ⁵
Nso190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	Ammonia-oxidizing bacteria	Mobarry <i>et al.</i> (1996) ⁶

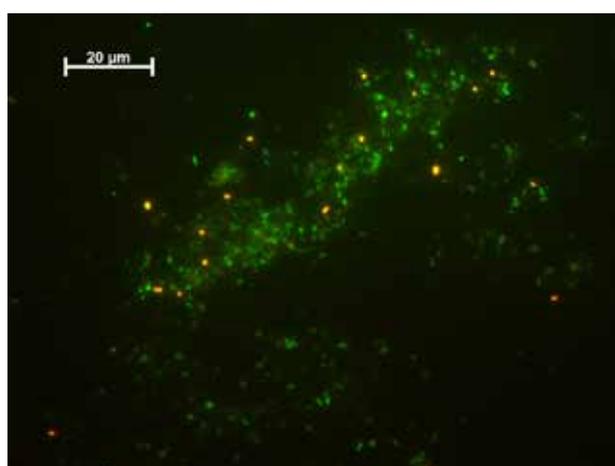


図 3.4 顕微鏡観察写真（緑：全細菌、赤：好気性アンモニア酸化細菌）
（図中の黄色の細胞が好気性アンモニア酸化細菌を示す。）

3.4.3 リアクター運転結果

プレ培養期間には、運転開始後すぐにアンモニアと亜硝酸の同時除去を確認し、アナモックス MBR として安定した運転を達成した。一槽型化開始日から基質の窒素パージを止めて、水中に溶解する溶存酸素を好氣的アンモニア酸化の酸素源として供給した（図 3.5、一槽型化開始日を 0 日目とした）。運転 12 日目には追加的に空気供給ラインを設置し、窒素循環ライン内を空気で置換することで供給酸素量を増やした。これにより、アナモックス反応に加えて好氣的アンモニア酸化反応が起きていることが示唆された。しかしながら、溶存酸素供給開始以降、基質瓶内で硝化反応が起こったために供給するアンモニア及び亜硝酸濃度が不安定であった。そこで、運転 70 日目からは基質の窒素パージを再開して空気供給ラインのみの酸素供給へ変更すると、基質濃度が安定した。その後、徐々に空気供給量を上げて運転を続けると、運転 99 日目には窒素負荷 $0.76 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ において最大窒素除去速度 $0.67 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ を達成した（アンモニア酸化率 99.1%）。この期間の槽内 DO 濃度は、 $0.2 \text{ mg-O}_2/\text{L}$ 程度に維持されていた。しかしながら、運転 100 日経過後からアナモックス反応量が減少し、好氣的アンモニア酸化反応が過剰となって槽内に亜硝酸が蓄積するようになった（約 20 mg-N/L ）。この時、ガスライン内で酸素濃度の制御が複雑化したために酸素が過剰に供給されており、槽内 DO 濃度が $0.3 \text{ mg-O}_2/\text{L}$ となっていた。運転 106 日目に空気供給ラインを改良すると 10 日ほどで窒素除去性能が回復したことから、本プロセスは槽内溶存酸素濃度を適切に保つことで安定的な低濃度アンモニア処理プロセスと成り得ることが示された。なお、顕微鏡観察の結果より槽内に亜硝酸酸化細菌の存在も確認されたが、槽内亜硝酸濃度 1.0 mg-N/L 未満かつ槽内 DO 濃度 $0.2 \text{ mg-O}_2/\text{L}$ の条件で運転を行うと亜硝酸酸化活性はあまり見られないという結果を得た。

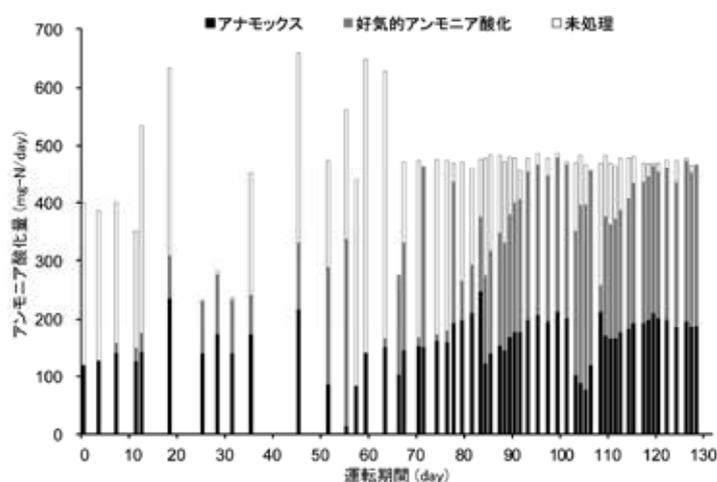


図 3.5 アンモニア酸化の寄与割合（計算値）

4. 結論

本研究では、アナモックス細菌とメンブレンバイオリアクターを組み合わせ、嫌気メンブレンアナモックスリアクターの開発とその発展性の検証を行った。淡水性メンブレンアナモックスリアクターの開発においては、運転初期より高い窒素除去性能を発揮し、約1ヶ月間の運転を通して安定的な窒素除去を達成することが出来た。また、膜分離によって菌体を槽内に完全保持できることから、スタートアップ時など菌体の増殖を目的とする場合に適用する優位性が示された。低温環境下においては、菌体量を確保してもアナモックス活性を維持することは出来なかったが、温度ショックを与えた菌体の活性の回復は早いことがわかった。海洋性アナモックス細菌の至適塩分濃度は、既報の報告では1.5-4.0%であるとされていたが、本実験系においては2.0%から0.5%まで塩分濃度を低下させてもアナモックス活性を維持するという結果を得た。海洋性メンブレンアナモックスリアクターの一槽型化は、槽内の溶存酸素濃度を0.2 mg-O₂/L程度に維持し、亜硝酸が蓄積しないようコントロールを行うことで、これまで安定的な処理が難しかった低濃度アンモニア含有廃水(50 mg-N/L)を対象とした亜硝酸型硝化-アナモックスプロセスを達成した。以上のように、嫌気性メンブレンアナモックスリアクターは発展性のあるシステムであることが示された。今後さらなる研究によって、有効な窒素除去処理システムとなることが期待される。

参考文献

1. 松永耕介, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良, 中原禎仁, 笹川学: アナモックス MBR における槽内蓄積物質の解析とファウリングへの影響, 第46回日本水環境学会年会講演集, p.146, 2012.
2. Lotti T., Kleerebezem R., Lubello C., van Loosdrecht M.C.M.: Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture, *Water Research*, Vol. 60, pp. 1-14, 2014.
3. Awata T., Oshiki M., Kindaichi T., Ozaki N., Ohashi A., Okabe S.: Physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium belonging to the “*Candidatus scalindua*” group, *Applied Environmental Microbiology* Vol. 79, pp. 4145-4148, 2013.
4. Amann R.I., Krumholz L., Stahl D.A.: Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, Vol. 172, pp. 762-770, 1990.
5. Daims H., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Schleifer, K-H. Wagner M.: In situ

characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, pp. 5273-5284, 2001.

6. Mobarry B.K., Wagner M., Urbain V., Rittmann B.E., Stahl D.A.: Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, 2156-2162. 1996.

謝辞

本研究は、公益財団法人 JFE21 世紀財団 2013 年度技術研究助成により行われた。記して感謝の意を表す。