

# 硝化脱窒細菌の窒素負荷履歴を考慮した 新たな活性汚泥モデルへの展開

A New Concept of Activated Sludge Model  
Considering Nitrogen Loading  
on Nitrification and Denitrification Bacteria



技術開発本部  
水・汚泥技術開発部 汚泥処理室  
山下 哲生  
Tetsuo Yamashita  
竹田 尚弘  
Naohiro Takeda  
技術開発本部  
環境分析センター  
皆川 美絵  
Mie Minakawa  
技術開発本部  
水・汚泥技術開発部 汚泥処理室  
赤司 昭  
Akira Akashi  
(医学博士)

活性汚泥モデル (ASMs) は排水処理設備の設計や維持管理にもちいられるなど、水処理に携わる人々にとって身近なツールとなりつつある。我々はさらなるモデルの予測精度の向上とキャリブレーション頻度を低減できる使いやすいモデルの構築にむけて、モデル内で表現されている硝化細菌および脱窒細菌数の挙動と反応速度との関連性の把握に取組んだ。リアルタイム PCR 法をもちいて窒素除去に寄与する生物数をモニタリングし、最大反応速度との関係性を評価した。その結果、硝化細菌や脱窒細菌の最大反応速度は（それらの細菌が曝された）負荷に応じて変化するという、従来の ASMs では表現されていない新たな事象を見出した。

ASMs has become practical tool for the engineers following the design and maintenance of biological wastewater treatment plants. In this report, we analysed the relationship between behavior of Nitrification and denitrification bacteria and their maximum reaction rates to achieve advanced activated sludge model. The number of microbe contribution to nitrogen removal was monitored by Real-time PCR method, and maximum reaction ratio was measured experimentally. As a result, a new phenomenon has observed that nitrification and denitrification maximum reaction ratio has changed by respective nitrogen loadings.

## Key Words :

活性汚泥モデル	Activated sludge models
リアルタイム PCR	Real-time PCR
硝化	Nitrification
脱窒	Denitrification
流入負荷	Influent loading
最大反応速度	Maximum reaction ratio

## まえがき

IWA 活性汚泥モデル (ASMs: Activated Sludge Models) を利用したシミュレーションソフトは、下水処理をはじめとする生物学的な排水処理設備の設計や運転管理の支援ツールとして期待されており、実務利用に向けた検討が進められている。<sup>1)</sup>

ASMs は、硝化細菌など水質浄化機能に応じて分類された生物群の増殖や死滅などを計算することで、処理水質等を予測するモデルである。ASMs には有機物や窒素の除去反応を表す反応プロセスがモデル式で表現されており、モデル式には生物の増殖速度や死滅速度を表す係数や、飽和係数・阻害係数などの多くのパラメータが存在する。ASMs をもちいて水質予測をおこなうには、適用する処理場や実験系に合わせてそれらのパラメータをキャリブレーションし最適化する必要がある。しかしながら、そのキャリブレーションは、反応に寄与する生物群に着目しておこなわれるのではなく、結果としてえられる処理水質をベースにおこなわれており、生物群の挙動について触れられることはほとんどなかった。

一方で、活性汚泥に含まれる微生物を遺伝子解析により定量する技術が飛躍的に発達しており、活性汚泥中の様々な微生物情報を高精度かつ短時間で入手することが可能になった。我々はいち早く、遺伝子解析によりえた水処理微生物情報を活用した水質管理に取組み、脱窒に寄与する nirS (亜硝酸還元酵素) 遺伝子数と処理水質との間に高い相関性が認められることを示した。<sup>2)</sup> よって、これらの遺伝子解析よりえた微生物群の情報を ASMs に組み込むことによって、より精度の高い処理水質の予測ができるのではないかと考えた。

本研究ではその取組みの第一段階として、遺伝子解析による微生物情報を基にした活性汚泥モデル開発に向けて、火力発電所硝化脱窒排水処理設備のアンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌および亜硝酸還元細菌を追跡調査した。同時に、硝化脱窒回分活性試験をおこない、最大反応速度を測定した。そして、これらの結果に対して細菌数あたりの窒素負荷と最大反応速度という新しい切り口でデータを解析した。これらの結果を基に微生物情報と ASMs との融合性について検討し、ASMs で記述されている窒素除去に係わる反応速度を、より普遍的に表現できるモデルの検討を試みた。

## 1. 検討方法

### 1.1 対象とする施設

本研究で対象とした火力発電所の排水処理設備のフローを図1に示す。排水処理設備に流入する原水は、アンモニアや硝酸などの窒素成分を含んでおり、下水と比較すると流入水質変動、水温ともに比較的安定している。アンモニアを含む原水は硝化槽に流入し硝化処理がおこなわれ、後段の脱窒槽ではメタノールを添加し脱窒処理がおこなわれ、硝化脱窒処理をおこなっている。7カ月間にわたって1週間に1~2回の頻度で硝化槽および脱窒槽より活性汚泥を採取し、すみやかに遺伝子解析用の凍結サンプル(-20℃保存)を作成し、後述する定量方法で細菌数を測定した。また生物の活性を評価するため後述する硝化脱窒回分活性試験を実施し、最大反応速度を測定した。

### 1.2 硝化脱窒に寄与する微生物

図2に硝化脱窒反応の成分の変遷とそれに寄与する微生物を示す。硝化反応に於いては、アンモニア

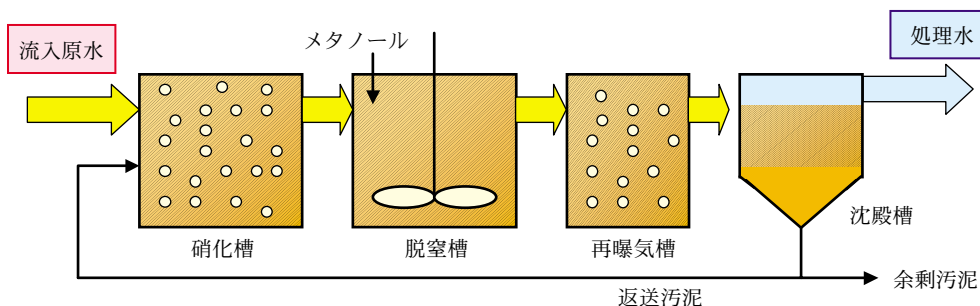


図1 調査対象施設の排水処理フロー

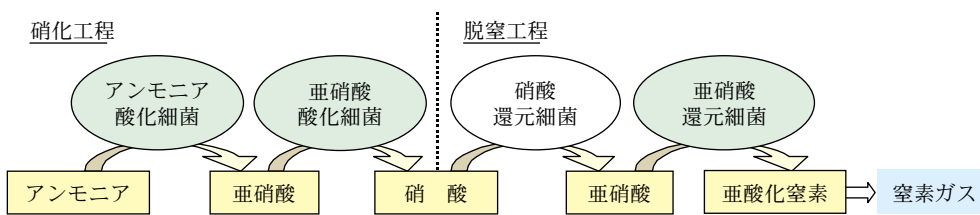


図2 硝化脱窒処理に寄与する微生物

表1 リアルタイム PCR 法にもちいたプライマーの一覧

	標的細菌	ターゲット	プライマー／プローブ	
硝化	アンモニア酸化細菌 (AOB)	16SrDNA	CTO 189fA/B	GGAGRAAAGCAGGGGATCG
			CTO 189fC	GGAGGAAAGTAGGGGATCG
			RT1r	CGTCCTCTCAGACCARCTACTG
			TMP1	CAACTAGCTAATCAGRCATCRGCCGCTC
脱窒	亜硝酸酸化細菌 (NOB)	<i>Nitrospira</i>	NSR1113f	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG
			NSR1264r	GTTTGCAGCGCTTTGTACCG
			NSR1143Taq	AGCACTCTGAAAGGACTGCCAGG
脱窒	亜硝酸還元細菌 (NIRB)	nirS	cd3aF	G TSAACG TSAAGGARACSGG
			R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA

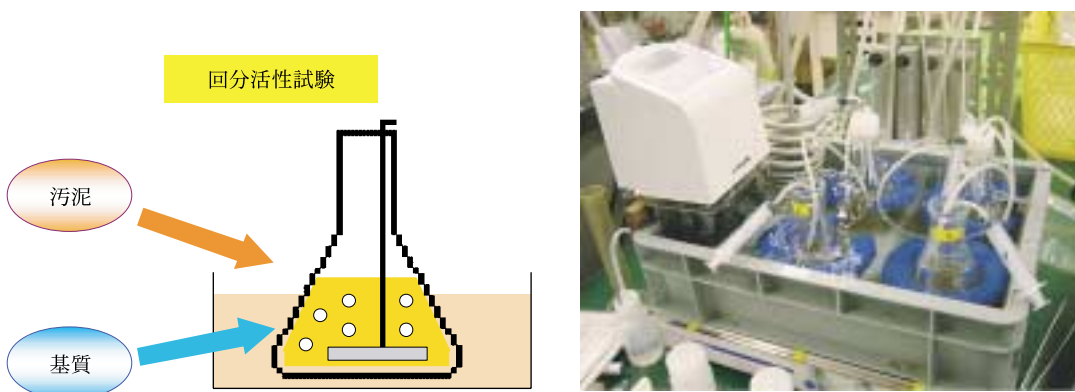


図3 回分活性試験装置

酸化細菌 (AOB: Ammonia-Oxidizing Bacteria) および亜硝酸酸化細菌 (NOB: Nitrite-Oxidizing Bacteria) が寄与し、脱窒反応においては、硝酸還元細菌および亜硝酸還元細菌 (NIRB: Nitrite-Reducing Bacteria) が寄与している。本報では、硝化工程は AOB および NOB、脱窒工程は NIRB に着目し細菌数の定量をおこなった。

### 1.3 細菌数の定量方法

AOB, NOB および NIRB の細菌数の定量はそれぞれリアルタイム PCR (Polymerase Chain Reaction) 法をもちいておこなった。表1に細菌数の定量にもちいたプライマーおよびプローブの一覧を示す。AOBの定量は、プライマーとして CTO 189fA/B と CTO 189fC の混合液 (モル比 2 : 1) と RT1r を、プローブとして TMP1 をもちいた TaqMan probe 法によりおこなった。<sup>3)</sup> NOB の定量は、*Nitrospira spp.* を対象とし、プライマーとして NSR1113f, NSR1264r を、プローブとして NSR1143Taq をもちいた TaqMan probe 法によりおこなった。<sup>4)</sup> NIRB の定量は、nirS を対象とし、プライマーとして cd3aF,

R3cd をもちいた SYBR Green 法によりおこなった。<sup>5)</sup>

### 1.4 硝化脱窒回分活性試験

対象施設の活性汚泥の最大アンモニア酸化速度、最大亜硝酸酸化速度、および最大亜硝酸還元速度を調べるために、それぞれの最大反応速度を測定する回分活性試験をおこなった。図3に回分活性試験装置の概略を示す。試験にもちいる汚泥は、残留している有機物などを取除くために、遠心分離し上澄み液を排除した。そして、濃縮した汚泥に最大反応速度をえるのに十分な基質や栄養塩等が含まれている希釈液を加えて、試験をおこなった。定刻ごとにサンプリングをおこない、ろ水の NH<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N を測定し、各性分の減少量から目的とするそれぞれの最大反応速度を算出した。

## 2. 結果および考察

### 2.1 対象施設の処理状況

流入原水の T-N は、調査期間中 40 mg/L 前後で推移した。その内訳は、約 60 % が NH<sub>4</sub>-N, 約 35 % が NO<sub>3</sub>-N, 残りの約 5 % が NO<sub>2</sub>-N であった。処理水の T-N は 1 ~ 5 mg/L で推移し、残留 T-N の大半は

NO<sub>3</sub>-Nであった。また、調査期間中のMLSSは、3500~4000 mg/Lで推移しており、大きな変動はなかった。

## 2.2 硝化細菌数および脱窒細菌数の推移

図4に硝化槽のAOB、NOBと脱窒槽のNIRBの活性汚泥1 mLあたりの細菌数の推移を示す。AOBは、 $2.77 \times 10^7 \sim 2.3 \times 10^8$  cell/mLで推移し、最大値と最小値で約8.3倍の差があった。NOBは、 $2.59 \times 10^6 \sim 2.43 \times 10^7$  cell/mLで推移し、最大値と最小値で約9.4倍の差が見られた。一方、NIRBは、 $1.52 \times 10^9 \sim 1.19 \times 10^{10}$  cell/mLで推移し、最大値と最小値で7.8倍の差があった。MLSSの変動が±10%程度であったことと比べると、MLSS中のAOB、NOBおよびNIRBの細菌数は比較的変動が大きかった。汚泥濃度の変動は小さくても、その中に含まれる個々の細菌数はそれよりも大きく変動していることが確認された。

## 2.3 最大アンモニア酸化速度、最大亜硝酸酸化速度および最大亜硝酸還元速度の変化

図5に硝化脱窒回分活性試験より求めた容積あたりの最大アンモニア酸化速度、最大亜硝酸酸化速度

および最大亜硝酸還元速度を示す。アンモニア酸化速度は6~17 mg-N・L<sup>-1</sup>・h<sup>-1</sup>、亜硝酸酸化速度は14~35 mg-N・L<sup>-1</sup>・h<sup>-1</sup>、亜硝酸還元速度は10~30 mg-N・L<sup>-1</sup>・h<sup>-1</sup>で推移しており、容積あたりの最大反応速度は活性が高いときと低いときの間で2~3倍の差を確認した。

さらに解析を進め、最大反応速度はその処理反応に寄与する細菌数にも依存すると考え、図4にて示したリアルタイムPCRにより解析した細菌数をもちいて細菌数あたりの最大反応速度を算出した。図6にAOB、NOB、NIRBの細菌数あたりの最大アンモニア酸化速度、最大亜硝酸酸化速度、亜硝酸還元速度をそれぞれ示す。最大アンモニア酸化速度は、50~300 fg-N・cell<sup>-1</sup>・h<sup>-1</sup>、最大亜硝酸酸化速度は、1000~10000 fg-N・cell<sup>-1</sup>・h<sup>-1</sup>、最大亜硝酸還元速度は、3~15 fg-N・cell<sup>-1</sup>・h<sup>-1</sup>を示し、電子供与体や電子受容体を十分に与えられた条件下で求めた最大反応速度であるにもかかわらず、いずれも大きく変動していた。ASM<sub>s</sub>では、たとえば最大アンモニア酸化速度は、硝化細菌の最大比増殖速度 $\mu_A$ と増殖収率 $Y_A$ の比で表現されており、これは定数値で与え

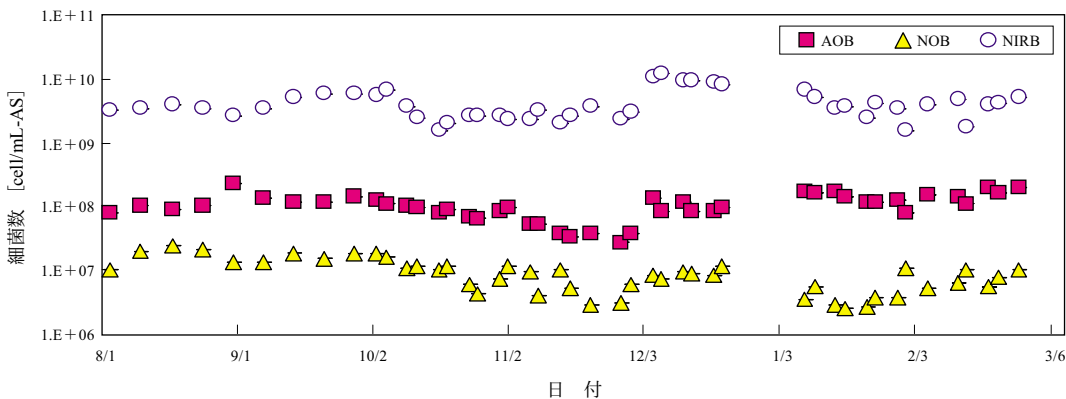


図4 AOB、NOB および NIRB 細菌数の経時変化

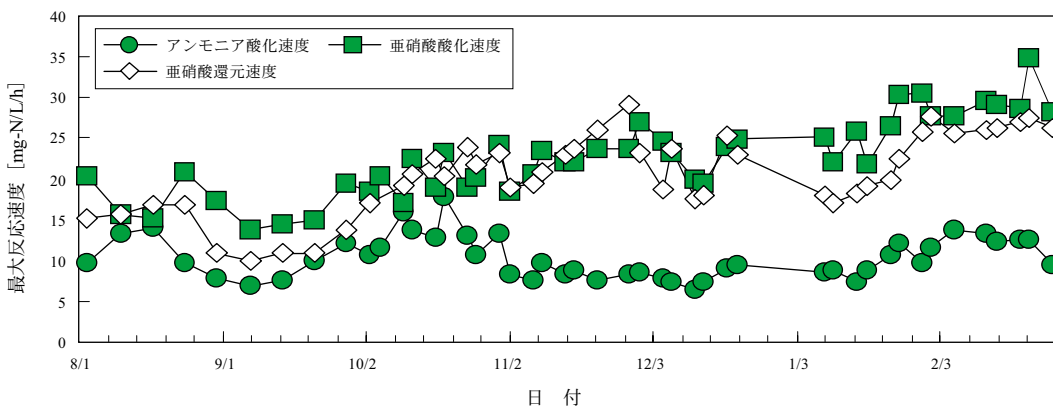


図5 容積あたりの最大反応速度の経時変化

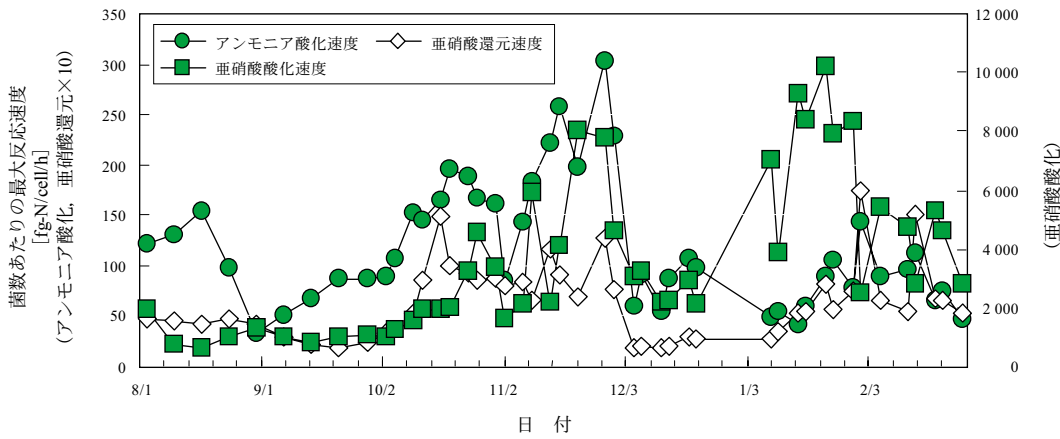


図6 細菌数あたりの最大反応速度の経時変化

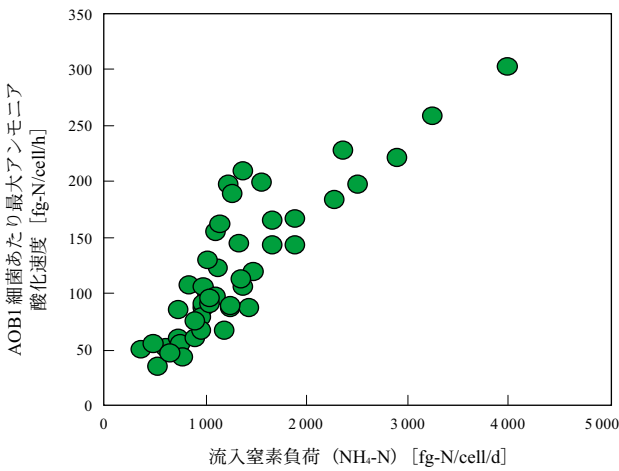


図7-(1) AOB1細菌あたりの流入窒素負荷と最大アンモニア酸化速度の相関

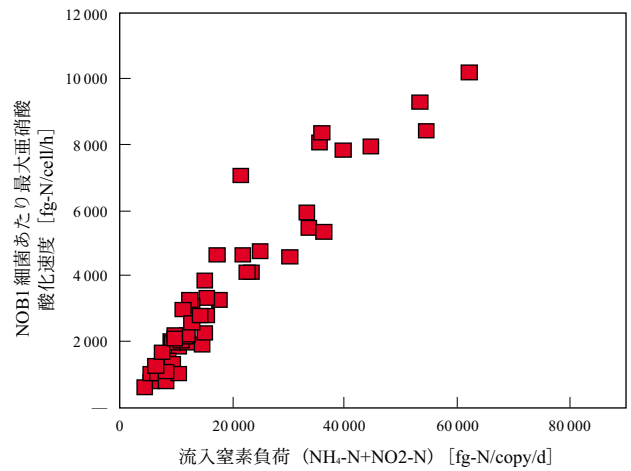


図7-(2) NOB1細菌あたりの流入窒素負荷と最大亜硝酸酸化速度の相関

られている。つまり、最大アンモニア酸化速度は運転の条件等によらず一定値として取扱われている。しかしながら、図6の結果は細菌数あたりの最大反応速度は一意的に決まらないことを意味しており、何らかの要因で変化している可能性を示唆している。

#### 2.4 最大反応速度の変動要因の検討

細菌数あたりの最大反応速度の変動要因を検討するために、図7-(1)にAOBの細菌数あたりのアンモニア負荷と最大アンモニア酸化速度との関係を示した。ここで前者は、汚泥を採取した直前までの1日コンポジットサンプルの $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度と流量から算出したアンモニア負荷をAOBの細菌数で除することにより求めたものであり、採取した汚泥がどの程度のアンモニア負荷状況で運転されていたのかを意味している。図7-(1)に見られるように、両者には非常に高い相関が認められ、細菌数あたりのアンモニア負荷が高い状況では、細菌数あたりの最大アンモニア酸化速度が高くなることが示された。また最大亜硝酸酸化速度や最大亜硝酸還元速度についても、同様の解析をおこなった結果を図7-(2)および

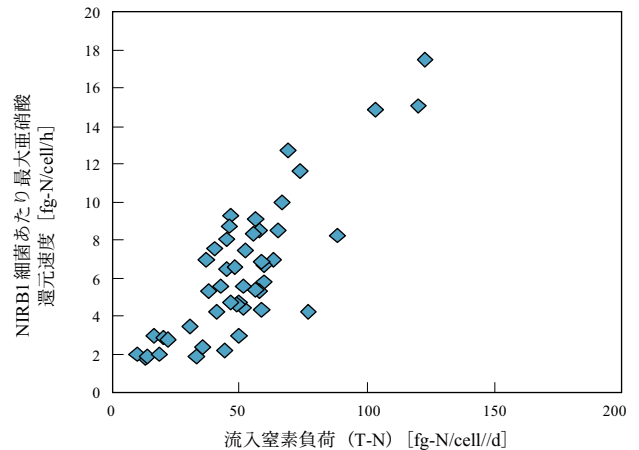


図7-(3) NIRB1細菌あたりの流入窒素負荷と最大亜硝酸還元速度の相関

(3)に示す。いずれの細菌においても細菌数あたりの負荷と最大反応速度との間に高い相関が認められ、細菌数あたりの負荷で最大反応槽度が変化する事象が、他の窒素除去工程や細菌においても確認された。

### 3. 反応速度式のモデル化構想

前記のように細菌数あたりという新しい切り口で

解析し、新たな知見としてえられた窒素負荷と最大反応速度との高い相関関係を ASMs へと組込むことを検討した。現在、ASMs で一般的に組込まれているアンモニア酸化反応の反応速度モデル式は次式で表される。

$$\frac{dS_{NH_4}}{dt} = \frac{\mu_{NH_4}}{Y_{NH_4}} \frac{S_{NH_4}}{K_{NH_4} + S_{NH_4}} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{ALK}}{K_{ALK} + S_{ALK}} X_{NH_4}$$

本式中では硝化細菌量あたりの最大アンモニア酸化反応速度は  $\mu_{NH_4}/Y_{NH_4}$  で表されることになる。従来の ASMs では  $\mu_{NH_4}$  や  $Y_{NH_4}$  には定数が与えられることから、細菌量あたりの最大反応速度は一定値として表現されている。しかしながら、本調査において、AOB 細菌数あたりの最大アンモニア酸化反応速度は一定でなく、変動するということが確認されており、AOB 細菌数あたりのアンモニアの負荷により変化する関数として方程式の中でモデル化することが妥当であると考えられる。これらの事象を考慮したモデル式を次式に示す。

$$\frac{dS_{NH_4}}{dt} = f_{NH_4}(t) \frac{S_{NH_4}}{K_{NH_4} + S_{NH_4}} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{ALK}}{K_{ALK} + S_{ALK}} X_{NH_4, cell}$$

ここで  $f_{NH_4}(t)$  は図 7-(1) に基づく AOB 細菌数のアンモニア負荷を変数とする関数である。また、アンモニア酸化細菌量を示す  $X_{NH_4, cell}$  については、キャリブレーションをおこなう際に数値を最適化する必要があるが、本法ではリアルタイム PCR 法による AOB 細菌数の定量値を利用して直接入力することが可能であり、キャリブレーションが容易となる。亜硝酸酸化反応および亜硝酸還元反応においても同

様に、NOB および NIRB の細菌数あたりの負荷を変数とする細菌数あたりの最大反応速度関数でモデル化することが可能である。

## む す び

硝化脱窒排水処理設備の細菌をリアルタイム PCR 法で定量化し、細菌数あたりの負荷と最大反応速度との関係を検討した。その結果、細菌数あたりの窒素負荷が高くなれば、細菌数あたりの最大反応速度が高くなるという新しい知見がえられた。従来の ASMs では、この最大反応速度は定数で与えられていることから、モデルの構造上、この変動を表現することはできなかったため、負荷の状況が変化した場合など、予測精度を維持するために頻りにキャリブレーションをおこなう必要があった。本報にて提案するモデルでは、細菌数あたりの窒素負荷に応じた最大反応速度の変動を適切に表現することにより、処理水質の予測精度の向上やキャリブレーション作業負荷の軽減、および頻度の低減が期待される。

今後は、我々の新しい概念を組込んだ新しいモデルをもちいて水質予測のシミュレーションをおこない、モデルの有効性について検討を進めていく。

## [謝 辞]

本研究は、(独)科学技術振興機構の平成18年度革新技术開発研究事業により実施した。ここに記して謝意を表す。

## [参考文献]

- 1) 日本下水道事業団「活性汚泥モデルの実務利用の技術評価に関する報告書」
- 2) 赤司昭, 山下哲生, 第40回日本水環境学会年回講演集, 39 (2006)
- 3) Hermansson, A, and Lindgren, P-E. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 972-976, (2001)
- 4) Harms, C. et al. *Environ. Sci. Technol.* 37, 343-351, (2003)
- 5) Throback, I. N. et al. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 401-417, (2004)