

(9) 亜硝酸による好氣的リン摂取阻害を緩和する脱リン細菌の脱窒能力

Nitrite Inhibition of Aerobic Phosphate Uptake Alleviated
by Denitrifying Activity of Polyphosphate Accumulating Organisms

吉田征史^{*}, 高橋紘平^{*}, 齋藤利晃^{***}, 田中和博^{***}

Yukihito YOSHIDA^{*}, Kohei TAKAHASHI^{*}, Toshiaki SAITO^{***}, Kazuhiro TANAKA^{***}

ABSTRACT ; In this study, an anaerobic/aerobic/anoxic/aerobic sequencing batch reactor (SBR) was operated with municipal wastewater to treat the nutrients. When nitrite was accumulated, aerobic phosphate uptake activity significantly decreased and in case of hard exposure to nitrite, BPR severely deteriorated. The interesting observation was that the relative anoxic activity of phosphate accumulating organisms (PAOs) increased after nitrite exposure. Moreover, batch tests of aerobic phosphate uptake in the presence/absence of nitrite indicated that PAOs with the higher relative anoxic activity were less sensitive to nitrite exposure. From these results, we concluded that BPR was sensitive to nitrite exposure, but BPR containing PAOs with the higher relative anoxic activity is possibly more stable against nitrite than BPR containing PAOs with the lower relative anoxic activity. To make clear the mechanism, several batch tests of aerobic phosphate uptake were conducted in the presence/absence of nitrite with OUR measurements. In the case of PAOs which had less anoxic activity, both oxygen respiration and phosphate uptake were damaged at almost the same level, but in the case of PAOs which had anoxic activity, oxygen respiration was more severely damaged than phosphate uptake. This higher 'apparent' P/O ratio indicates that some of denitrifying PAOs can utilize nitrite under aerobic condition.

KEYWORDS ; Nitrite, Inhibition, Biological phosphorus removal, Polyphosphate accumulating organisms, Sequencing batch reactor

1. はじめに

公共用水域の富栄養化に対処するため、下水処理において生物学的リン除去が採用されて久しい。しかし、生物学的リン除去は未だしばしば処理が不安定になることが知られており、不安定化因子の早急な解明が求められている。これまで不安定化因子として、1) グリコーゲン蓄積細菌との競合¹⁾、2) 低有機物負荷²⁾、3) 嫌気槽への硝酸の流入³⁾、4) 過剰なエアレーション⁴⁾などが挙げられているが、未だ明らかにされていない因子も数多く存在するとされている。我々が本研究で注目した亜硝酸も、その未解明因子候補の1つである。亜硝酸は、一般的な従属栄養細菌の増殖や呼吸を阻害する物質として知られている^{5,6)}が、脱リン細菌 (PAOs) についてもいくつかの報告がある。例えばKubaら⁷⁾やMeinholdら⁸⁾は、亜硝酸が無酸素的リン摂取 (溶存酸素非存在下、硝酸を電子受容体として用いたリン摂取) を阻害する事を報告している。また、酸素を電子受容体として用いた好氣的なリン摂取に対しては、松尾ら⁹⁾やSaitoら¹⁰⁾が亜硝酸による阻害を報告している。しかし、亜硝酸がPAOs

^{*} 日本大学大学院理工学研究科土木工学専攻 (Dept. of Civil Engineering, Graduate School of Science and Technology, Nihon University)

^{***} 日本大学理工学部土木工学科 (Dept. of civil Engineering, College of Science and Technology, Nihon University)

の活性を阻害するというこれら一連の報告があるにも係らず、また、生物学的リン除去がしばしば窒素除去と併用されるために、PAOsが常に亜硝酸の蓄積リスクに曝されているという実態にも係らず、生物学的リン除去に与える亜硝酸の影響はこれまであまり注目されていない。特に、実下水を対象とした生物学的リン除去に与える亜硝酸の影響は報告が無い。その理由は明らかでは無いが、亜硝酸による阻害が再現性に欠けるため、汚泥が亜硝酸に対する耐性を獲得したという曖昧な表現で済ませてきたのではないかと考えている。一般的な通性嫌気性細菌は、亜硝酸を還元する酵素は細胞質膜のペリプラズム空間側に存在している¹¹⁾ため、亜硝酸は硝酸のように細胞質膜を透過¹²⁾する必要が無い。従って、好気条件下においても亜硝酸を還元し、阻害を緩和し得る¹³⁾。PAOsについては、純菌を用いた呼吸酵素群に関する検討がなされていないため詳細は不明であるが、無酸素的リン摂取を担う、脱窒能力を有するPAOs(脱窒性PAOs)も亜硝酸還元酵素を有し、電子受容体として利用できる^{8),14),15),16)}ことから、恐らくはペリプラズム空間側に存在し、好気条件下においても亜硝酸を還元する事ができると考えられる。すなわち、脱窒能力を持たないもしくは脱窒能力の小さい好気性PAOsと比較して亜硝酸阻害への感受性が低いことが予想される。従って、脱窒性PAOsと好気性PAOsの存在比が多様に変化する実処理場の汚泥では、亜硝酸に対して再現性の無い阻害応答を示すのは当然である。また、脱窒能力の大小によって亜硝酸に対する阻害応答が異なることは、亜硝酸曝露の結果として、PAOs全体としての脱窒能力の向上に繋がり得る。すなわち、仮に脱窒性PAOsと好気性PAOsの両種が存在するとすれば、両種の存在比によってPAOs全体の脱窒能力が決まる。もし亜硝酸が存在すれば、脱窒性PAOsの方が好気性PAOsより競合上有利なため、次第にPAOs全体の脱窒能力が上昇する事が予想される。PAOsに、脱窒能力を有する通性嫌気性のPAOs(脱窒性PAOs)と酸素しか利用できない絶対好気性のPAOsの2種類が存在する¹⁷⁾のか、または、1種類のPAOsの脱窒酵素誘導レベルが異なる¹⁸⁾のかについては議論が分かれているが、何れにせよ脱窒酵素の誘導レベルの異なる複数のPAOsが共存するという考え方は適用可能であり、同様の理論が成立すると考えられる。

以上の推論を検証するために、本研究では1)実下水を用いて嫌気/好気/無酸素/好気回分式活性汚泥法を運転し、亜硝酸蓄積時の生物学的リン除去の挙動およびPAOsの脱窒能力の変化を観察した。その結果、亜硝酸蓄積により生物学的リン除去が阻害を受けること、および脱窒性PAOsが好気性PAOsよりも亜硝酸阻害に対する感受性が低いことが確認された。このため、2)脱窒性PAOsの好気条件下における亜硝酸阻害の緩和能力について調べるため、脱窒能力の異なる数種類の汚泥を用いて亜硝酸を添加した好氣的リン摂取回分試験を実施し、リン摂取速度と酸素利用速度(OUR)の挙動を調べた。

2. 実験方法

2.1 実下水を用いた回分式活性汚泥法の運転

(1) 実験装置および実験条件

実験は図1に示す有効容積100Lの反応槽を用いて回分式活性汚泥法(SBR)を行った。流入水には沈砂池流出水を用い、レベルセンサーを用いて流入・排水量を正確に調整した。曝気は反応槽底部から行い、反応槽内を確実に混合できるようプロペラを3段に配置した攪拌機を用いた。運転工程は図2に示すとおり流入攪拌、曝気、攪拌、再曝気、沈殿、排水の6工程から成る嫌気/好気/無酸素/好気法であり、余剰汚泥の排出は再曝気工程終了前の6分間に行った。

Run1 (0~195日)は1サイクル288分、引抜比1/3、HRT 14.4 h、平均SRT、A-SRTはそれぞれ19.4、7.1日で運転を行った。

続いてRun2 (196~295日)では、リン除去への亜硝酸の影響を検証することを目的に、脱リン細菌増殖のために嫌気時間を延長し、亜硝酸が蓄積するようにA-SRTを短くする運転に切り替え、1サイクル360分、引抜き比1/2、HRT 12.0 h、平均SRT、A-SRTはそれぞれ15.4、4.3日で運転を行った。

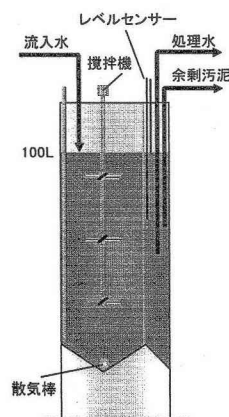


図1：実験装置

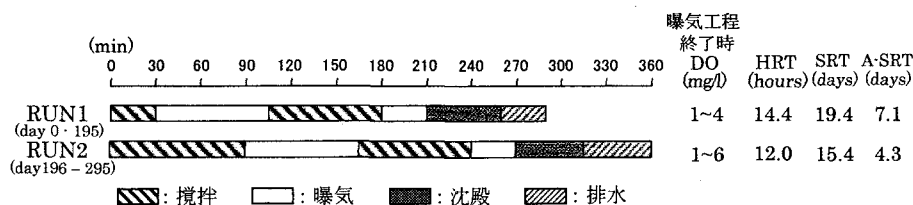


図 2 : 実験条件

(2) 嫌気/好気および嫌気/無酸素脱リン活性試験

試験に用いる汚泥は回分式反応槽から最もリン含有量が多いと思われる再曝気工程終了時に採取した。実験はまず、嫌気条件において酢酸を添加し140分間リン放出を行った。次に汚泥を2つに分け、一方は曝気を行い好気条件、もう一方は硝酸を添加、攪拌することで無酸素条件においてリン摂取試験を行った。嫌気および無酸素条件においては酸素の混入を防ぐため反応槽を密閉し、気相を窒素ガスで置換した。また、試験中1NのNaOHを用いてpHは約7.0に調整した。これらの試験から好氣的リン摂取速度と無酸素的リン摂取速度を求めた（本論文においては、3.1に示すような1サイクル中におけるリン摂取速度と区別するため、このような理想的な回分実験条件下で測定したリン摂取速度を以下「リン摂取活性」と表記する）。また、汚泥中の全PAOs量に対する脱窒性PAOsの優占率を示す指標として、無酸素的リン摂取活性/好氣的リン摂取活性×100から算出した、脱窒性脱リン活性比¹⁸⁾を用いた。

2.2 嫌気/好気および嫌気/無酸素SBRによる人工下水を用いたPAOsの集積培養

脱窒能力の異なる脱リン細菌（好気性PAOsおよび脱窒性PAOs）を集積するために、電子受容体として酸素を用いる嫌気/好気（A/O）SBRと、電子受容体として硝酸を用いる嫌気/無酸素（A/A）SBRをそれぞれ人工下水（酢酸400mgCOD/l、リン酸30mgP/l、アンモニア40mgN/l、その他のミネラル類は文献¹⁰⁾を参考にした）を用いて運転した。A/O SBRは有効容積4L、流入/攪拌180分、曝気130分、沈殿/排水50分で運転し、硝化細菌抑制のため適宜アルチオ尿素(ATU)を添加した。A/A SBRは有効容積1L、流入/攪拌120分、無酸素190分（始めの75分間硝酸を添加（合計量は反応槽内で46mgN/l））、沈殿/排水50分で運転し、酸素の混入を防ぐため、ほぼ密閉された反応槽を用いた。両反応槽とも引抜比1/2、SRT10日に設定し、運転中pHは1NのHClおよびNaOHを用いて約7.0に調整した。なお、pHコントローラーの誤作動を防ぐため、沈殿/排水工程にはコントローラーが停止するようにした。

2.3 亜硝酸添加および無添加による好氣的リン摂取活性試験

(1) 脱窒性脱リン活性比の相違と亜硝酸に対する感受性の関係

培養過程の相違から、脱窒性脱リン活性比の異なる3種の汚泥（2.1に示した実下水を用いた汚泥（SBR汚泥）、2.2に示した人工下水を用いた汚泥（A/O汚泥、A/A汚泥））を用いてそれぞれの好氣的リン摂取活性に与える亜硝酸の影響を調べた。試験に用いる汚泥は、SBR汚泥は再曝気工程終了時のものを採取し、まず酢酸を添加して嫌気条件におけるリン放出を約2時間行った。A/OおよびA/A汚泥は、嫌気工程終了時のものを採取し、実験に用いた。実験開始前にそれぞれ2.6に示す手法で酢酸を測定し、嫌気条件中に検出限界以下まで完全に摂取されたことを確認した後、汚泥を4つの小型反応槽に分取、各々に異なる濃度の亜硝酸（反応槽内で0,1,3,5mgN/l）を添加し、曝気を開始することで好気条件におけるリン摂取の挙動をモニターした（汚泥3種×各4系列の計12系列）。各系列のリン酸の減少速度からリン摂取活性を求め、「亜硝酸添加系（1,3,5mgN/l）の活性/亜硝酸無添加系（0mgN/l）の活性×100」により「リン摂取活性残存率(%)」を求めた。また、試験中pHは1NのHClおよびNaOHを用いて約7.0に調整し、曝気は過曝気で行い、DOを十分に高く保った。なお、SBR汚泥系については、硝化反応の影響を避けるためにアンモニアを含まない系で実験を行った。

(2) 亜硝酸添加時のリン摂取活性とOURの関係

2.3(1)に示した試験の結果を踏まえ、ここでは酸素利用速度 (OUR) も併せて測定した。詳細なその理由については3.4で説明する。試験に用いる汚泥はA/OおよびA/A SBRから嫌気工程終了時に採取し、それぞれの汚泥を2つに分け、一方は曝気だけを行い、もう一方は曝気に加え亜硝酸が5mgN/lとなるように添加して試験を開始した。試験中pHは1NのHClおよびNaOHを用いて約7.0に調整し、曝気は過曝気で行い、DOを十分に高く保った。なお、OUR測定は、A/OおよびA/A SBRから曝気工程開始時の汚泥を採取し、DO計を設置した密閉系小型反応槽に移してDOの減少を5秒毎にモニターした。その後も適宜汚泥を採取し、同様にDOの減少をモニターした。

2.4 分析方法

活性汚泥と、ろ液サンプルの分離には0.45 μ mのメンブレンフィルターを用いた。T-N、T-P、リン酸およびMLSS、MLVSSの測定は下水試験方法¹⁹⁾に準じて行った。アンモニア性窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、酢酸はWaters製のCapillary Ion Analyzerを用いて測定した。CODクロムの測定にはHACH社のCODキットを用いた。

3. 実験結果および考察

3.1 実下水を用いたSBRの処理状況

実験期間を通して制限曝気であったこと、水温が変化したことにより生じた硝化反応形態の変化から、表1に示すように4つの特徴ある期間に分類することができる。このように分類された各期間における処理状況および運転条件を表2に、各期間を代表する1サイクルの変化を図3に示す。0日目から76日目は、DO制限に加え、低水温期であったことにより、アンモニアの硝化に伴い生成される酸化態窒素が、反応槽内に蓄積することなく脱窒される、いわゆる同時硝化脱窒による窒素除去が行われており、この硝酸も亜硝酸も蓄積しない期間においては、処理水にアンモニアが残存するものの、T-NおよびT-P除去率はそれぞれ84%、90%であった。しかし、77日目から195日目(亜硝酸型-1)は、水温が上昇するにつれ硝化細菌の活性が高まり、亜硝酸が徐々に蓄積し始め、好気工程において3mgN/l程度の亜硝酸が蓄積した。このとき、リン除去率としては95%と良好であったが、図3に示すとおり、リン摂取速度は同時硝化脱窒期よりも低下しており、好気工程において全量のリン酸が摂取されず、残りは再曝気工程において摂取されていた。また、水温の上昇に伴いT-N除去率は91%と高くなった。その後、196日目から243日目(Run2, 硝酸型)は、窒素除去が亜硝酸型から硝酸型へ徐々に移行し、亜硝酸の蓄積は無く、完全に硝酸経由となっており、T-N除去率は90%と亜硝酸型-1期同様であった。また、この期間では図3に示すとおり、嫌気工程延長によりリン放出・摂取が活発になり、リン摂取は曝気工程において完了し、T-P除去率は96%と高い値であった。しかし、Run1と比較して嫌気工程のみを延長したことでA-SRTが短縮され、244日目から295日目(亜硝酸型-2)においては、再び亜硝酸が蓄積した。この期間では、図3のように、曝気工程終了時に6mgN/l程度の亜硝酸が蓄積しており、このときのリン放出および摂取は著しく悪化し、その結果、平均的なT-P除去率は59%に低下した。これらの結果から、亜硝酸が生物学的リン除去の不安定化因子である可能性が示唆されたが、サイクル変化だけではその影響を的確には捉えられないため、活性試験の結果から以下に考察する。

表1：硝化形態による各期間の分類

	期間	期間の名称	硝化反応の特徴
RUN1	① Day 0-76	同時硝化脱窒	同時硝化脱窒
	② Day 77-195	亜硝酸型-1	亜硝酸±硝酸混在
RUN2	③ Day 196-243	硝酸型	硝酸のみ蓄積
	④ Day 244-295	亜硝酸型-2	亜硝酸のみ蓄積

表 2：各期間における処理状況および運転条件

流入水						運転条件					
	RUN1 同時硝化脱窒 (Day0 - 76)	RUN1 亜硝酸型-1 (Day77 - 195)	RUN2 硝酸型 (Day196 - 243)	RUN2 亜硝酸型-2 (Day244 - 295)	単位		RUN1 同時硝化脱窒 (Day0 - 76)	RUN1 亜硝酸型-1 (Day77 - 195)	RUN2 硝酸型 (Day196 - 243)	RUN2 亜硝酸型-2 (Day244 - 295)	単位
水温	15.4	18.9	27.0	22.6	℃	MLSS	4060	2686	3183	2789	mg/l
COD _{cr}	312	276	364	228	mgCOD/l	MLVSS	3407	2376	2581	2330	mg/l
酢酸	10.0	11.7	6.17	11.97	mgCOD/l	MLVSS/MLSS	85	83	81	84	%
T-P	4.3	4.0	4.7	2.8	mgP/l	SRT	19.3	19.4	13.9	16.4	日
T-N	35.6	33.8	31.9	23.8	mgN/l	A-SRT	7.0	7.1	3.7	4.8	日
処理水											
T-P	0.45	0.22	0.20	1.35	mgP/l						
T-N	5.7	3.2	3.3	4.0	mgN/l						
T-P除去率	90	95	96	59	%						
T-N除去率	84	91	90	83	%						

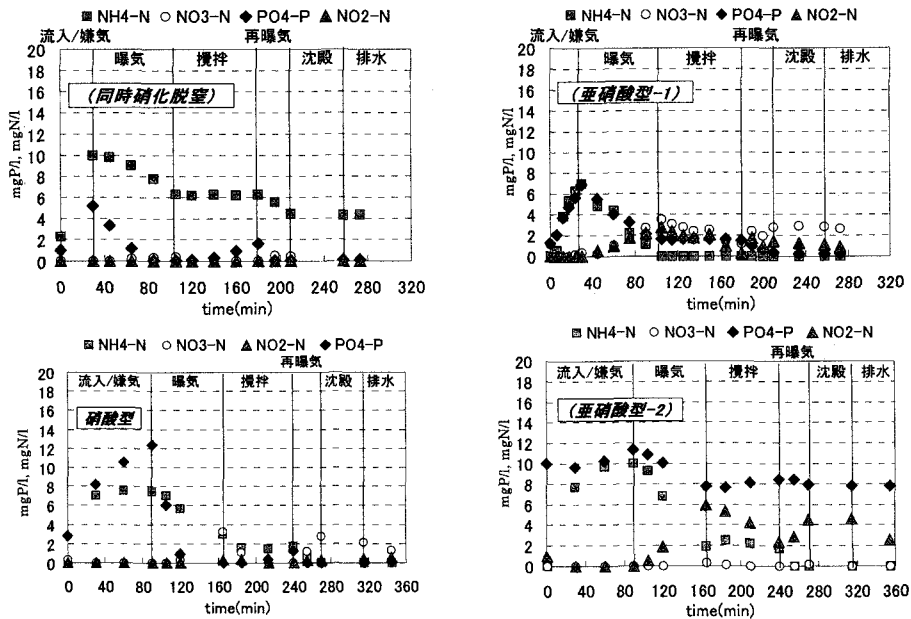


図 3：各期間での代表的な 1 サイクルの変化

3.2 リン摂取活性試験から求めた脱リン活性の推移

好氣的リン摂取活性、無酸素的リン摂取活性と脱窒性脱リン活性比の各期間における経日変化を図4に示す。図を見ると、同時硝化脱窒期には亜硝酸の蓄積は無く(左下図)、好氣的リン摂取活性は13.3mgP/gVSS.hであった(左上図)。また、無酸素的リン摂取活性は1.1mgP/gVSS.hであり(右上図)、その結果、脱窒性脱リン活性比は8%と算出された(右下図)。しかし、亜硝酸型-1期に移り、93日から135日にかけて曝気工程終了時の亜硝酸が3.0mgN/l程度蓄積し続けた際に、好氣的リン摂取活性が106日に8.4mgP/gVSS.h、126日には3.0mgP/gVSS.hと、同時硝化脱窒期と比較して約77%低下したことが確認できる。亜硝酸型-1期は3.1でも述べたとおり、再曝気工程終了時にほぼ全量のリン酸が摂取されており(図3)、T-P除去率としては95%と良好ではあったが、曝気工程においてリン酸が残存した期間である。このため、3mgN/lの亜硝酸蓄積は、除去率には影響を及ぼさなかったが、PAOsのリン摂取活性には明らかに障害を与えていたと言える。また、同期間において無酸素的リン摂取活性も低下しているにも係らず、脱窒性脱リン活性比は増加傾向を示した。その後、203日までに硝化形態が亜硝酸型から硝酸型へと推移し、亜硝酸蓄積が減少するのに従って、好氣的および無酸素的リン摂取活性が回復している。また、203日には、ほぼ完全に硝酸型の硝化となり、硝酸蓄積が6.5mgN/lに対し、亜硝酸蓄積は0.6mgN/lまで低

下した。その結果、Run2-硝酸型期、239日には好気的および無酸素のリン摂取活性はそれぞれ14.0、2.7mgP/gVSS.hと実験期間における最大値を示し、この亜硝酸蓄積が低下を続けた期間の脱窒性脱リン活性比は20%前後で安定していた。しかし、Run2では嫌気工程延長に伴いA-SRTが短縮されたため、硝化形態は再び亜硝酸型へと推移し、亜硝酸型-2期、260日に6.0mgN/lの亜硝酸が蓄積した。このとき再び好気的および無酸素のリン摂取活性が著しく低下し、好気的リン摂取活性は14.0 mgP/gVSS.hから0.9mgP/gVSS.hへと約93%低下し、脱窒性脱リン活性比が33%に増加した。さらにその後、亜硝酸蓄積が比較的高濃度(5mgN/l)で蓄積を続け、288日には脱窒性脱リン活性比が48%に増加した。以上のことから、亜硝酸が生物学的リン除去を著しく阻害するものであることが明らかとなり、生物学的リン除去の不安定化因子の一つと成り得ることが示唆された。

また、亜硝酸蓄積によって好気的リン摂取活性が著しく阻害を受けたことから、無酸素のリン摂取活性も低下しているにも係わらず、見かけ上脱窒性脱リン活性比が増加したことは興味深いことであり、この結果から、我々は脱窒性PAOsが好気性PAOsよりも亜硝酸阻害を受け難いと考え、このことを検証するために、2.2に示したA/OおよびA/A法により電子受容体の異なる（酸素と硝酸）条件で集積培養したPAOsを用いて、亜硝酸添加系および無添加系での好気的リン摂取活性試験を実施した。

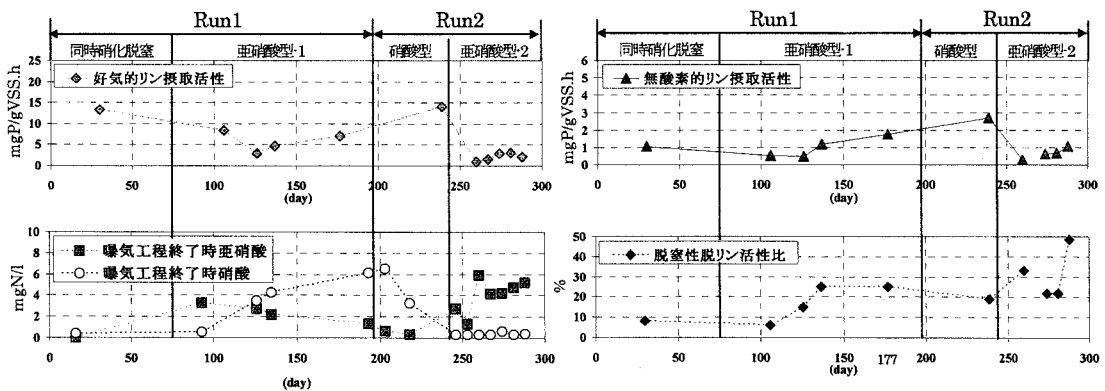


図4：SBR内における亜硝酸、硝酸蓄積と脱リン活性の推移

3.3 亜硝酸添加および無添加における好気的リン摂取活性試験

亜硝酸添加系および無添加系における好気的リン摂取活性試験の結果（リン酸および亜硝酸の経時変化）を図5に、実験結果から算出した各系列の好気的リン摂取活性、リン摂取活性残存率(2.3参照)および亜硝酸消費速度を示す。なお、SBR汚泥はRun1(亜硝酸型-1期)における177日目の汚泥(脱窒性脱リン活性比25%)を用いている。また、リン摂取活性は、実験開始後20分間の直線近似できる部分から算出している。図5を見ると、すべての系において亜硝酸添加濃度が高くなるほど、リン摂取活性が低下しており、亜硝酸が好気的リン摂取を著しく阻害していることが確認された。しかしながら、各汚泥におけるリン摂取挙動は明らかに異なっており、A/O汚泥の場合、わずか1mgN/lの初期添加濃度で著しく阻害を受けていた。一方、実下水を用いて培養していた汚泥(SBR汚泥)の場合、1mgN/lの初期添加濃度では阻害は観察されなかった。しかし、初期添加濃度3mgN/lでは著しく阻害を受けた。また、A/A汚泥では、3mgN/lにおいても無添加系の約80%の活性を維持していたが、5mgN/lでは無添加系の約40%に低下するという結果ではあったが、他の汚泥に比べて比較的影響は小さかった。なお、A/OおよびA/A汚泥系では、PAOsの増殖に伴うアンモニアの減少が観察され、亜硝酸無添加および添加系での減少を比較した結果、増殖にも亜硝酸阻害の影響が見られたが、変化が微量なため、その影響を明確に評価できないため、結果を省略した。

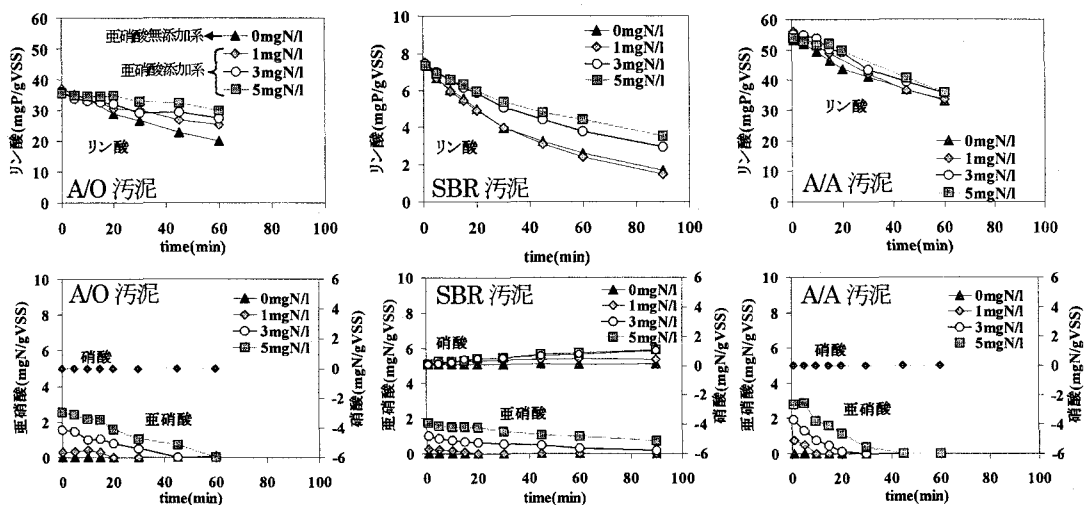


図5：亜硝酸添加実験におけるリン酸と酸化態窒素の挙動

表3：亜硝酸添加実験における好気的リン摂取活性、リン摂取活性残存率、亜硝酸消費速度

亜硝酸初期濃度 (mgN/l)	好気的リン摂取活性 (mgP/gVSS.h)			リン摂取活性残存率 (%)			亜硝酸消費速度 (mgN/gVSS.h)		
	A/O 汚泥	SBR 汚泥	A/A 汚泥	A/O 汚泥	SBR 汚泥	A/A 汚泥	A/O 汚泥	SBR 汚泥	A/A 汚泥
0	23	9	31	100	100	100	-	-	-
1	17	8	29	72	92	93	2.4	0.9*	5.2
3	6	6	24	28	66	79	2.4	1.1*	5.6
5	2	4	11	8	49	37	3.3	0.8*	4.9

MLVSS: A/O 汚泥(1896mg/l), SBR 汚泥 (3097mg/l), A/A 汚泥 (1370mg/l)

脱窒性脱リン活性比: A/O 汚泥 (ほぼ0%), SBR 汚泥 (25%), A/A 汚泥 (55%)

*この速度は硝化速度 (亜硝酸減少量と硝酸生成量が一致していた。)

また、リン摂取活性残存率と亜硝酸初期添加濃度(絶対濃度(mgN/l)ではなく比濃度(mgN/gVSS))の関係を示すと図6のようになる。比濃度による評価を行った理由は、絶対濃度よりも比濃度の方が無酸素リン摂取活性への亜硝酸の影響を評価する際に適していたと報告している文献⁸⁾や、同様に、亜硝酸の影響は「阻害」というよりも「毒性」に近いという見解から、比濃度の方が実際の現象をうまく表現できそうであると提唱している文献¹⁰⁾があるためであり、我々も同様に比濃度による評価を利用した。図6を見ると、汚泥濃度に対する亜硝酸濃度が低濃度であっても阻害を受ける順序と、脱窒性脱リン活性比の高さの順序には負の相関があり、言い換えれば脱窒性脱リン活性比が高い汚泥ほど、亜硝酸阻害に耐性を持つことが明らかとなった。この結果は、亜硝酸を用いることによって脱窒性PAOsの好気性PAOsとの競合という観点において、脱窒性PAOsが優占化するための選択的な因子に成り得ることが示唆される。

また、この実験におけるその他の興味深い知見として、好気条件であるにもかかわらず、SBR汚泥では亜硝酸が硝化反応を受けて硝酸が生成されるのに対し、A/OおよびA/A汚泥においては亜硝酸が、硝酸生成されることなく減少していた。基質に使用している人工下水のみを用いて同様の回分試験を行った結果、亜硝酸は全く減少しなかった

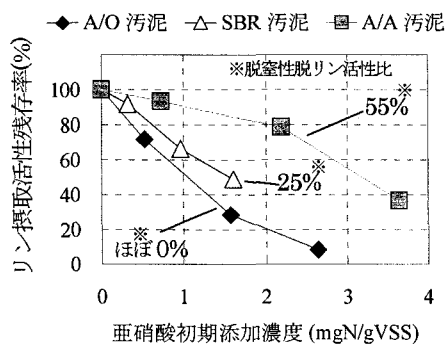


図6：亜硝酸初期添加濃度とリン摂取活性残存率

ため、この現象が生物学的な反応であることは確認している。さらに、活性比の高い汚泥ほど亜硝酸消費速度が早かった(A/O汚泥2.4~3.3mgN/gVSS.h、A/A汚泥4.9~5.2mgN/gVSS.h(表3参照))。このことから、脱窒性PAOsが好気条件下において亜硝酸を消費している可能性が考えられた。

3.4 亜硝酸添加/無添加におけるリン摂取活性とOURの関係

3.2 において亜硝酸がリン摂取を著しく阻害することが明らかとなり、リン摂取が阻害を受けるということはPAOsの呼吸にも亜硝酸が影響している可能性が考えられ、さらに3.3において、脱窒性PAOsが好気条件下で亜硝酸を消費している可能性が考えられたため、A/OおよびA/A汚泥を用いて同様に、亜硝酸無添加と添加による回分実験を行い、OURも併せて測定した。その結果を図7および表4に示す。表4に示すとおり、脱窒性脱リン活性比0%のA/O汚泥をAO-1、25%のA/O汚泥をAO-2、70%のA/A汚泥をAA-1と明記する。今回の実験においても3.3同様、硝酸の生成無く亜硝酸が消費されていた。また、アンモニアも同様に、これらの汚泥には硝化細菌が存在しないため、PAOsの増殖に伴うアンモニアの減少が観察され、その結果、増殖にも亜硝酸阻害が影響することが示唆されたが、変化が微量でその影響を明確に評価できないため、結果を省略した。

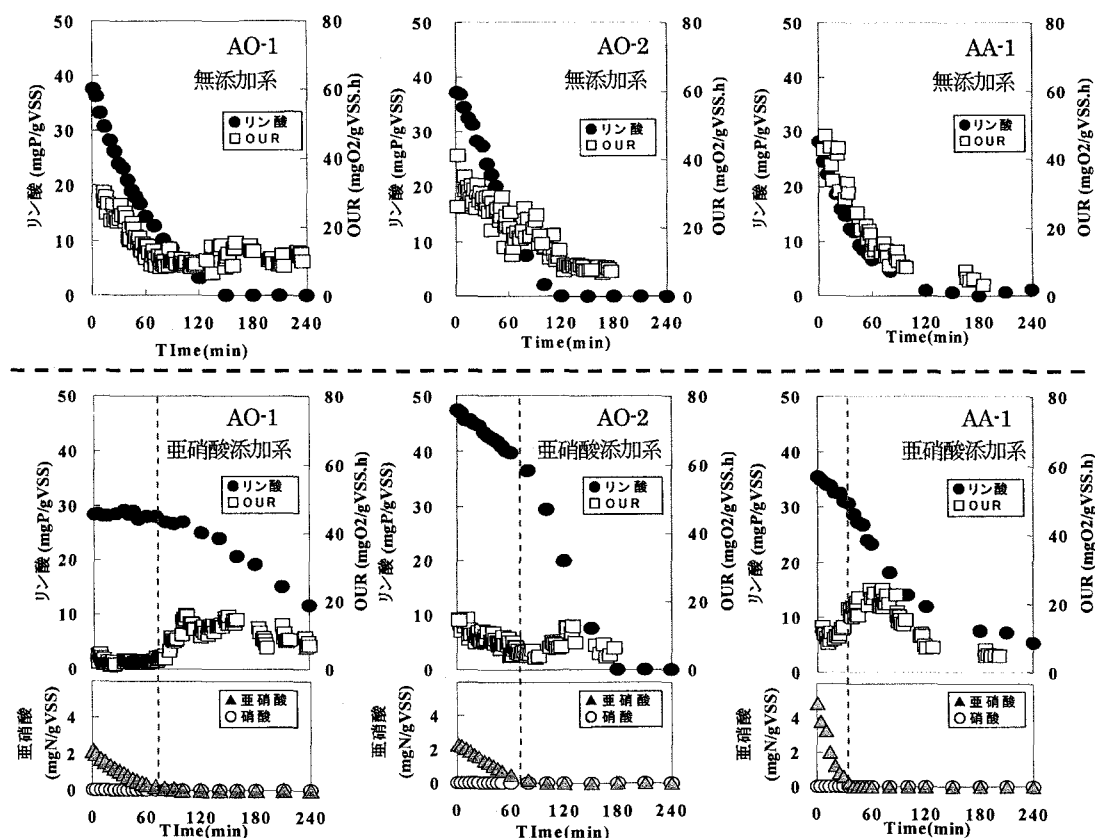


図7：亜硝酸無添加および添加実験におけるリン酸、OUR、亜硝酸の経時変化

図7を見ると、亜硝酸無添加系(上段図)の場合、初期OURが最も高く、時間とともにOURは減少した。(このOURカーブは既存の報告²⁰⁾と類似のカーブである。)リン酸濃度も同様に、時間とともに直線的に減少した。一方、亜硝酸添加系(下段図)の場合、リン酸濃度とOURに特徴的なカーブが観察された。亜硝酸が添加された実験開始当初は無添加系と比較して低いOURが観察され、その後OURが一度増加して再び低下している。これ

らの変動はリン酸濃度の変化と対応しており、リン酸濃度は初期において徐々に低下し、その後 OUR の増加と同調して突然リン酸濃度が低下した（リン摂取速度が増加した。）さらに、これらの突然のリン摂取と OUR の増加は亜硝酸の消失時間と一致していた（AO-1 では約 90 分、AO-2 では約 100 分、AA-1 では約 40 分）。リン摂取は呼吸により生成されるエネルギーを必要とするため、これらの結果は、亜硝酸によるリン摂取の阻害が、酸素呼吸の抑制によるものであることを示唆している。

また、この実験における各系列での OUR およびリン摂取活性残存率の結果を図 8 に示す。亜硝酸添加系におけるリン酸濃度の変化は直線的ではなかったため、活性を求めるために使用する区間はとても重要である。本研究では、実験開始から 30 分まで、もしくは開始から亜硝酸が消失するまでの区間を選択した。図 8 より、脱窒性脱リン活性比が著しく低い AO-1 の場合、OUR の活性残存率とリン摂取活性残存率がそれぞれ 8% と 1.2% であり、比較的高い脱窒性脱リン活性比を有していた AO-2 と AA-1 ではそれぞれ 31% と 36%、28% と 35% で、AO-1 は AO-2 と AA-1 と比較して著しく小さな値であった。

また、AO-2 と AA-1 において、OUR の活性残存率よりもリン摂取活性残存率が高かったことは興味深い結果である。その結果、OUR に対するリン摂取活性から算出した見かけの P/O 比（OUR に対するリン摂取活性）（表 4）を見ると、AO-1 では無添加系（0.26 molP/mole）よりも亜硝酸添加系（0.03 molP/mole）の方が低いにも係わらず、AO-2 と AA-1 では逆に高くなっていた（AO-2 無添加系：0.18 molP/mole、AO-2 添加系：0.21 molP/mole、AA-1 無添加系：0.17 molP/mole、AA-1 添加系：0.21 molP/mole）。これらの結果は、比較的高い脱窒能力を有する AO-2 と AA-1 の場合では、亜硝酸添加条件下におけるリン摂取のための酸素呼吸の見かけの効率が、脱窒能力を持っていない AO-1 よりもかなり大きいことを示している。今回の実験では既存の文献²⁰⁾のようにリン酸を無添加で測定した OUR データが無いため、真の P/O 比ではなく、見かけの P/O 比であり、ある程度の不確実さは含んでいるものの、算出された見かけの P/O 比は、既存の文献値²⁰⁾（0.23 molP/mole）と比較しても近い値（0.17 ~ 0.26 molP/mole）であり、全く検討はずれの値ではなかった。リン摂取は呼吸によって得られるエネルギーを用いて行われるにも係わらず、過曝気条件での好氣的リン摂取活性試験においてリン摂取が受けた阻害よりも呼吸が受けた阻害が大きいことは考え難い。また、図 6 におけるリン酸の挙動を見ても、亜硝酸消失時の屈曲点以外はほぼ直線的な変化をしているため、化学凝集によりリン酸が除去された形跡も無いように考えられる。そのため、これらの結果を説明する一つの可能性として、脱窒性 PAOs による好気条件下での亜硝酸利用が考えられ、酸素呼吸量に対する余分なリン摂取量は好気条件下において脱窒性 PAOs が亜硝酸呼吸をすることによって行われた可能性があると考えられた。

また、消費された亜硝酸がリン摂取に利用されたと仮定し、見かけの P/N 比（亜硝酸消費速度に対するリン摂取速度）を算出すると、AO-2 と AA-1 において 0.03 ~ 0.08 molP/mole の範囲で得られた。これらの値は既存の知見による無酸素条件下、硝酸での値²⁰⁾（0.19 molP/mole）よりも少し小さい値であったが、好気条件下における見かけの P/N 比の他の文献が無いため、これらの値の精度を確認することは困難であった。

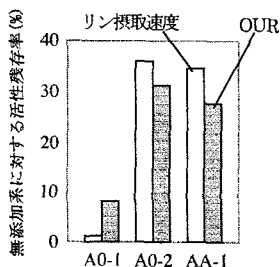


図 8：各汚泥における OUR およびリン摂取活性残存率

表 4：亜硝酸無添加および添加系における好氣的リン摂取回分試験結果

	A/O 汚泥				A/A 汚泥	
	AO-1		AO-2		AA-1	
	無添加	添加	無添加	添加	無添加	添加
脱窒性脱リン活性比 (%)	0		25		70	
亜硝酸添加濃度 (mgN/gVSS)	0	2.1	0	2.3	0	4.9
好氣的リン摂取活性 (mgP/gVSS.h)	24.6	0.3	22.2	8.0	26	9.0
亜硝酸消費速度 (mgN/gVSS.h)	-	2.0	-	2.0	-	11
OUR (mgO ₂ /gVSS.h)	25	2.0	32	10	40	11
見かけの P/O 比 (molP/mole)	0.26	0.03	0.18	0.21	0.17	0.21
見かけの P/N 比 (molP/mole)	-	-	-	0.08	-	0.03

4. 結論

本研究では、実下水を用いた嫌気/好気/無酸素/好気法による回分式活性汚泥を運転し、亜硝酸蓄積時のデータから、生物学的リン除去に与える亜硝酸の影響を検討したところ、次のような結果が得られた。

- ・ 硝化反応が同時硝化脱窒、もしくは硝酸型の時期ではリン除去率、リン摂取活性ともに良好であったが、亜硝酸型硝化の場合では阻害を受けた。具体的には、亜硝酸蓄積が 3mgN/l 程度であれば、T-P 除去率には影響を及ぼさなかったが、リン摂取活性は明らかに低下していた。しかし、亜硝酸蓄積が 6mgN/l 程度においては、除去率までもが著しく低下した。これらのことから、亜硝酸は生物学的リン除去の不安定化因子のひとつであることが明らかとなった。
- ・ 亜硝酸暴露前後における活性試験によるリン摂取活性の変化を好氣的リン摂取、無酸素的リン摂取とともに調べた結果、好氣的リン摂取および無酸素的リン摂取のいずれもが低下したが、無酸素的リン摂取活性への影響の方が小さく、亜硝酸阻害によって見かけ上脱窒性脱リン活性比が高まることが観察された。

次に、亜硝酸蓄積時に見かけ上脱窒性脱リン活性比が向上した理由を検討するため、実下水により培養された汚泥の他に、嫌気/好気および嫌気/無酸素回分式活性汚泥法で培養した、脱窒性脱リン活性比の異なる数種の汚泥を用いて亜硝酸添加濃度を変えた好氣的リン摂取活性試験を行ったところ、次のような結果が得られた。

- ・ いずれの汚泥の場合も亜硝酸添加濃度を高くするとリン摂取活性が低下したが、脱窒性脱リン活性比の高い汚泥ほどその阻害は小さかった。従って、脱窒性脱リン細菌は好気性脱リン細菌よりも亜硝酸阻害を緩和する能力に優れていると考えられる。このことは好気性脱リン細菌との競合という観点において有利であり、実下水を用いた回分式活性汚泥法において、亜硝酸蓄積時に脱窒性脱リン活性比が向上した理由の1つは、亜硝酸による両種の競合関係の変化によるものと推察された。
- ・ 脱窒性脱リン活性比の高い汚泥において、硝化反応以外の反応により亜硝酸が消費される速度が速かったことから、脱窒性脱リン細菌は、亜硝酸を除去し、その影響を緩和する何らかの機能を有していることが示唆された。

そこで、OUR を組み合わせた同様の活性試験を行い、脱窒性脱リン活性比の高い汚泥ほど亜硝酸の影響を受け難い理由を呼吸との関係でより詳しく検証したところ、次のような結果が得られた。

- ・ 亜硝酸の存在時に酸素呼吸が著しく阻害され、亜硝酸が消失すると回復する傾向が見られた。また、3種類の汚泥に対し、いずれも亜硝酸存在時の酸素呼吸活性の残存率とリン摂取活性の残存率がほぼ同程度であったことから、亜硝酸によるリン摂取阻害は、呼吸阻害と関連していることが示唆された。
- ・ 脱窒性脱リン活性比の低い汚泥の場合、見かけの酸素利用効率(P/O 比)が亜硝酸無添加系より亜硝酸添加系の方が低かったのに対し、脱窒性脱リン活性比の高い汚泥の P/O 比は、亜硝酸無添加系より添加系の方が高い傾向を示した。このことから、脱窒性脱リン細菌は好気条件下においても亜硝酸を電子受容体として利用(呼吸)している可能性が示唆され、それが呼吸阻害の緩和、すなわちリン摂取活性に対する亜硝酸の影響を緩和したのではないかと推察された。

謝辞：本研究を進めるにあたり、多大なるご尽力を頂いた日立プラント建設㈱に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Liu, W. T., Nakamura, K., Matsuo, T., Mino, T., (1997). Internal energy-based competition between polyphosphate and glycogen-accumulating bacteria in biological phosphorus removal reactors—effect of P/C feeding ratio. *Water Res.* 31 (6), 1430-1438.
- 2) Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Brandse, F.A. and Heijnen, J.J. (1997). Occurrence of denitrifying phosphorus removing bacteria in modified UCT-type wastewater treatment plants. *Water Res.* 31 (4), 777-786.
- 3) Hascoet, M.C. and Florentz, M., (1985). Influence of nitrates on biological phosphorus removal from wastewater. *Water Sci. Tech.* 11 (1), 1-8.
- 4) Brdjanovic, D., Slamet, A., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J., (1998). Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Water Res.* 32 (1), 200-208.
- 5) Rowe, J.J., Yarbrough, J.M., Rake, J.B. and Eagon, R.G., (1979). Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Curr. Microbiol.* 2, 51-54.
- 6) Yarbrough, J.M., Rake, J.B. and Eagon, R.G., (1980). Bacterial inhibitory effects of nitrite: inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 831-834.
- 7) Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J., (1996). Effect of cycle oxygen exposure on the activity of denitrifying phosphorus removal bacteria. *Wat. Sci. Tech.* 34 (1-2), 33-40.
- 8) Meinhold, J., Arnold, E. and Isaacs, S., (1999). Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Res.* 33 (8), 1871-1883.
- 9) 松尾吉高, 山本文宣 (1989). 嫌気的活性汚泥法における亜硝酸塩の脱窒の表現とその生物学的リン除去への影響. 下水道協会誌 26 (305), 49-56.
- 10) Saito, T., Brdjanovic, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2004). Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Res.* 38 (17), 3760-3768.
- 11) Alefunder, P.R. and Ferguson, S.J. (1980). The location of dissimilatory nitrite reductase and the control of dissimilatory nitrate reductase by oxygen in *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* 192, 231-240.
- 12) Kucera, I., Lau, I.K.J. and Dadak, V. (1983). The function of cytoplasmic membrane of *Paracoccus denitrificans* in controlling the rate of reduction of terminal acceptors. *Eur. J. Biochem.* 136, 135-140.
- 13) Hernandez, D. and Rowe, J.J. (1987). Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 745-750.
- 14) Lee, D.S., Jeon, C.O. and Park, J.M. (2001). Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system. *Water Res.* 35 (16), 3968-3976.
- 15) Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S. and Hirata, A., (2001). Metabolic behavior of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 92 (5), 442-446.
- 16) 庄司仁, 佐藤弘泰, 味越俊 (2004). 亜硝酸を電子受容体とするリン除去汚泥の代謝能力と細菌群集構造. 環境工学研究論文集 41, 291-300.
- 17) Kerm-Jespersen, J.P. and Henze, M., (1993). Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Res.* 27 (4), 617-624.
- 18) Wachtmeister, A., Kuba, T., Van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1997). A sludge characterization assay for aerobic and denitrifying phosphorus removing sludge. *Water Res.* 31 (3), 471-478.
- 19) 日本下水道協会. 1997. 下水試験方法 1997 年版
- 20) Smolders G.J.F., van der Meij J., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. (1994). Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotech. Bioeng.* 44, 837-848.
- 21) Kuba T., Smolders G., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1993). Biological phosphorus removal from wastewater by an anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Wat. Sci. Tech.* 27 (5-6), 241-252.