

〈研究発表〉

硝化脱窒細菌の最大活性の変動を考慮した活性汚泥モデルの開発

竹崎 潤¹⁾, 山下 哲生¹⁾, 辻 幸志²⁾, 藤田 昌史³⁾, 味埜 俊⁴⁾, 赤司 昭¹⁾

(株)神鋼環境ソリューション 技術開発本部 (〒651-2241 神戸市西区室谷 1-1-4, E-mail: j.takezaki@kobelco-eco.co.jp)¹⁾

山梨大学大学院 医学工学総合教育部 (〒400-8511 甲府市武田 4-3-11)²⁾

茨城大学 工学部 (〒316-8511 日立市中成沢町 4-12-1)³⁾

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 (〒277-8563 柏市柏の葉 5-1-5)⁴⁾

概要

火力発電所の生物学的硝化脱窒排水処理設備を対象に、窒素処理量による硝化脱窒最大反応速度の変動を考慮した活性汚泥モデルを開発した。ここで提案するモデル開発の中で考慮している、細菌数あたりの窒素処理量が高くなると細菌数あたりの最大反応速度が高くなるという相関関係は、約2年間の長期にわたって得られることを確認した。また、硝酸還元反応に関わる細菌についても同様の相関関係が認められることを確認した。本モデルを用いてシミュレーションを行った結果、反応槽内の窒素濃度の挙動を精度よく再現でき、窒素負荷が大きく変動するケースで本モデルが有効である事を確認した。

キーワード: 活性汚泥モデル, 硝化脱窒, 最大反応速度, シミュレーション, リアルタイム PCR 法

1. はじめに

IWA 活性汚泥モデル (ASMs: Activated Sludge Models) は、下水処理をはじめとする生物学的排水処理場の設計、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¹⁾。

ASM では、活性汚泥による水質の浄化プロセスをシミュレーションすることが可能である。ASM を個別の施設に適用するためのキャリブレーションは、処理水質に基づいて行われており、反応に関与する細菌に着目して行われることは少なかった。

一方で近年になって、分子生物学的手法による活性汚泥中の細菌の解析が行われるようになり、細菌数を高精度かつ短時間に定量することが可能になってきている。我々は、昨年度の本学会において、火力発電所硝化脱窒排水処理設備の活性汚泥中のアンモニア酸化細菌 (AOB)、亜硝酸酸化細菌 (NOB) および亜硝酸還元細菌 (NIRB) の存在数量を定量し、それぞれの細菌数あたりの窒素処理量と最大反応速度の関係を解析したところ、細菌数あたりの窒素除去量に応じて細菌数あたりの最大反応速度が変化することを報告した²⁾。ASM では、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が、この概念を新たに ASM に組み込むことで、より高精度なシミュレーションを行うことが可能になるのではと考えた。

本研究では、硝化脱窒に寄与する細菌の最大反応速度の変動を考慮したモデルを提案し、そのモデルの有効性を検証した。昨年に引き続き火力発電所硝化脱窒排水処理設備の AOB、NOB、NIRB のそれぞれの存在数量と最大反応速度から提案するモデルの再現性を

検討するとともに、新たに硝酸還元細菌 (NARB) の *narH* 遺伝子あたりの硝酸還元量と最大硝酸還元速度の関係を回分式硝化脱窒試験装置 (SBR: Sequencing Batch Reactor) を対象にモデルのキャリブレーションを行い、ASM3 と水質予測結果の比較を行い、提案するモデルの妥当性を評価した。

2. 遺伝子数あたりの窒素処理量と最大反応速度の関係

2.1 方法

(1) 対象とした施設

本研究で対象とした火力発電所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、BOD はほとんど含まれていない。下水と比較すると流入水質、水温ともに安定している。原水は硝化槽に流入し硝化処理され、後段の脱窒槽ではメタノールをプロトンとして脱窒処理される。約2年間にわたり硝化槽・脱窒槽より活性汚泥を採取し、速やかに遺伝子解析用凍結サンプル (-20°C) を作成するとともに、後述する回分活性試験による最大反応速度の評価を行った。

(2) リアルタイム PCR 法による遺伝子コピー数の定量

火力発電所排水処理設備の活性汚泥に存在するアンモニア酸化細菌 (AOB)、亜硝酸酸化細菌 (NOB)、および硝酸還元細菌 (NARB)、亜硝酸還元細菌 (NIRB) を解析対象として、リアルタイム PCR 法により遺伝子コピー数を定量した。AOB 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) の定量は、プライマー CTO 189fA/B と CTO 189fC の混合液 (2:1) と RTr1 を使用し、TMP1 をプローブとして TaqMan プローブ法により行った³⁾。

NOB 16S rDNA の定量は、*Nitrospira* sp. を対象とし、プライマー NSR1113f, NSR1264r、プローブ NSR1143Taq を使用して TaqMan プローブ法により行った⁴⁾。昨年の報告では解析できていなかった NARB については *narH* 遺伝子を定量対象としてプライマー narH50f と独自設計のプライマー narHr3b を使用してインターカレーター法により行った。さらに、NIRB については *nirS* 遺伝子を定量対象としてプライマー cd3aF, R3cd を用いてインターカレーター法により行った⁵⁾。

(3) 回分活性試験による最大反応速度の評価

火力発電所排水処理設備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、および最大硝酸還元速度、最大亜硝酸還元速度を調べるために、回分活性試験を行った。それぞれの試験に用いる汚泥は遠心分離により濃縮・回収した。最大反応速度を得るのに十分な量の基質や栄養塩等が含まれている希釈水を加え、試験を行った。一定時間ごとにサンプリング・ろ過を行い、ろ液の NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N 濃度を測定して目的とする各最大反応速度を算出した。

2.2 遺伝子数あたりの窒素処理量と最大反応速度の相関関係の持続性

AOB 16S rDNA コピー数あたりの NH₄-N 処理量と AOB 16S rDNA コピー数あたりの最大 NH₄-N 酸化速度との関係を調べた (Fig. 1)。両者には高い相関性が認められ、長期的な調査においても AOB 16S rDNA コピー数あたりの NH₄-N 処理量が高い状況では、AOB 16S rDNA コピー数あたりの最大 NH₄-N 酸化速度が高くなる事が示された。NOB 16S rDNA、*nirS* 遺伝子コピー数あたりの最大 NO₂-N 酸化速度、最大 NO₂-N 還元速度についても同様に解析を行った結果、遺伝子コピー数あたりの処理量との間にある高い相関性が長期間にわたって成立する事を確認した。

また、今回新たに NARB の *narH* 遺伝子コピー数あたりの NO₃-N 還元量と最大 NO₃-N 還元速度の関係についても検討を行った (Fig. 2)。その結果、他の反応と同様に両者には高い相関性が認められ、*narH* 遺伝子コピー数あたりの NO₃-N 還元量が高い状態では、*narH* 遺伝子コピー数あたりの最大 NO₃-N 還元速度が高くなる事が示された。これにより、硝化脱窒に関わる一連の主要な細菌について同様の相関関係が確認された。

なお、AOB および NOB、NIRB 細胞 1 個あたりに含まれる 16S rDNA コピー数および *nirS* 遺伝子コピー数は 1 個であり⁶⁾、16S rDNA コピー数、*nirS* 遺伝子コピー数はそのまま AOB、NOB、NIRB 細菌数に置き換える事ができる。また、NARB 細胞 1 個あたりの *narH* 遺伝子コピー数は明らかではなく、Fig. 2 の関係はコピー

数によって数値が変化するが、相関関係は維持される。つまり、細菌数あたりの処理量が高い状況では、細菌数あたりの最大反応速度が高くなる事になる。

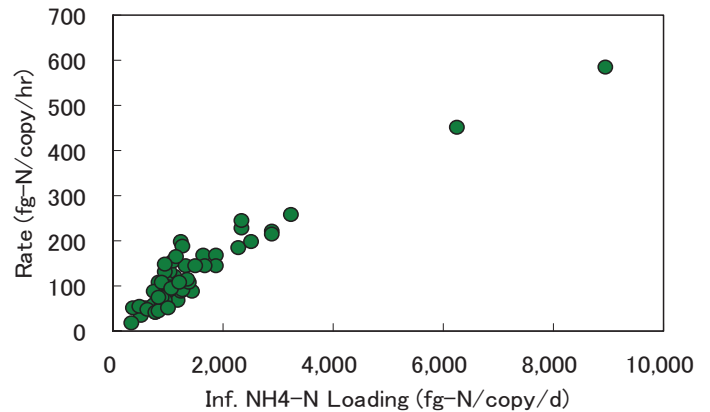


Fig. 1: Relationship between gene specific influent NH₄-N loading and gene specific maximum NH₄-N oxidation rate.

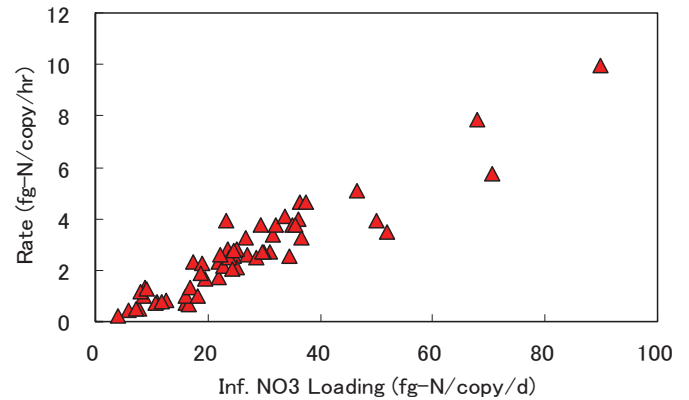


Fig. 2: Relationship between gene specific influent NO₃-N loading and gene specific maximum NO₃-N reduction rate.

2.3 最大反応速度変動を考慮したモデルの提案

現在 ASM3 で一般的に組み込まれている NH₄-N 酸化反応速度のモデル式を式 (1) に示す。

$$\frac{dS_{NH_4}}{dt} = \frac{\mu_A}{Y_A} \frac{S_{O_2}}{K_{A,O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NH_4}}{K_{A,NH_4} + S_{NH_4}} \frac{S_{ALK}}{K_{A,ALK} + S_{ALK}} X_A \quad (1)$$

AOB 細菌量 X_A あたりの最大 NH₄-N 酸化速度は、硝化細菌の最大比増殖速度 μ_A と増殖収率 Y_A の比 (μ_A/Y_A) で表され、従来は μ_A や Y_A には定数値が与えられる事から、細菌数あたりの最大反応速度は一定値として表現されている。

しかし本研究において、AOB 細胞 1 個あたりの最大 NH₄-N 酸化速度は変動する事が確認された事から、AOB 細胞 1 個あたりの NH₄-N 処理量により変化する関数として、方程式の中でモデル化する事が妥当であると考えられた。これらの概念を考慮した NH₄-N 酸化反応速度のモデル式を式 (2) に示す。

$$\frac{dS_{NH_4}}{dt} = f_{AOB}(t) \frac{S_{O_2}}{K_{A,O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NH_4}}{K_{A,NH_4} + S_{NH_4}} \frac{S_{ALK}}{K_{A,ALK} + S_{ALK}} X_{A,cell} \quad (2)$$

3. 提案モデルの妥当性の評価

3.1 評価方法

最大反応速度の変動を考慮したモデルの妥当性を確認するため、運転条件変更などの設定を行いやすい硝化脱窒試験装置を対象に、モデルの構築およびキャリブレーションを行った。また、試験装置の運転結果を対象に既存モデルとの予測精度の比較を行った。

(1) 計算対象とした実験系

モデルのキャリブレーションおよび再現性確認の対象として、回分式硝化脱窒試験装置(以下 SBR 装置)を用いた。SBR 装置は有効容積 35 L、HRT=15 hr とし、窒素容積負荷=0.04~0.2 kg-N/m³/d で変動させた。運転サイクルは原水投入・好気時間(硝化工程)=2 hr、無酸素時間(脱窒工程)=2 hr、再曝気時間(酸化工程)=1 hr、沈殿・排出時間(排出工程)=1 hr の合計 6 hr の工程を 1 サイクルとし、1 日に 4 サイクル繰り返した。窒素負荷変動前後で酸化工程中の汚泥を採取し、遺伝子解析用凍結サンプル(-20℃)を作成するとともに、後述する硝化脱窒回分活性試験を行った。

(2) 細菌数の定量および回分活性試験

SBR 装置の活性汚泥に存在する AOB、NOB、NARB、NIRB の定量、および最大反応速度の評価は、実設備汚泥を対象に実施した場合と同様の方法を採用した。ここで、NARB 数については、便宜上 NIRB の 1 ゲノム上に *narH* 遺伝子が 1 つ存在すると仮定して定量した。

(3) 計算モデル

計算は ASM_s のコアモデルである ASM3 をベースとし、NH₄-N 酸化反応、NO₂-N 酸化反応、および NO₃-N 還元反応、NO₂-N 還元反応を個別に再現できるように、NO₂-N の酸化還元プロセスを組み込んで行った。また、それぞれの反応に関与する細菌量は、リアルタイム PCR 法で定量した細菌量を COD_{Cr} に変換して与えた。

3.2 SBR 装置を対象としたモデルの作成

SBR 装置を解析対象として、細菌数と最大反応速度の解析を行った。SBR 装置においても、細菌数あたりの NH₄-N 処理量が高い状況では、細菌数あたりの最大 NH₄-N 酸化速度が高くなる事が示された(Fig. 3)。また、他の各細菌についても同様に相関関係が認められた。式(2)の $f_{AOB}(t)$ は、Fig. 3 の相関より求める事ができ、AOB 細胞 1 個あたりの NH₄-N 処理量に応じて変化する、式(3)で示す関数で与えた。

ここで、 L_{AOB} : AOB 細胞 1 個あたりの NH₄-N 処理量 (fg-N/cell/hr)、 a_{AOB} 、 b_{AOB} : 定数 (fg-N/cell/hr) である。 a_{AOB} 、 b_{AOB} については Fig.3 のプロットの近似曲線とな

るよう数値の設定を行った。

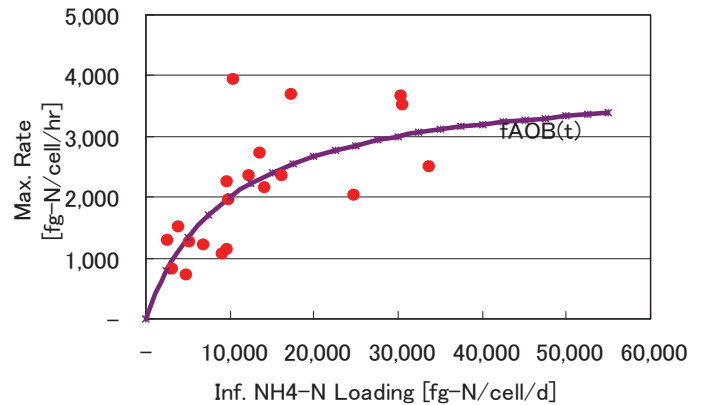


Fig. 3: Relationship between cell specific influent NH₄-N loading and cell specific maximum NH₄-N oxidation rate in SBR.

$$f_{AOB}(t) = \frac{a_{AOB}L_{AOB}}{b_{AOB} + L_{AOB}} \quad (3)$$

同様に、NO₂-N 酸化反応、NO₃-N 還元反応、NO₂-N 還元反応についても細菌数あたりの処理量と最大反応速度の相関から関数を作成した。脱窒反応については、無酸素条件下における従属栄養微生物 (X_H) による易分解性有機物 (S_s) の貯蔵プロセスに組み込む事により反映させた。

3.3 提案モデルの評価

提案モデルの妥当性を評価するため、SBR 装置にて窒素負荷を 2.5 倍に変更した場合の水質のシミュレーションを、ASM3 と提案モデルを用いて行った。負荷上昇直後(0 hr)、および負荷上昇後 48 hr のサイクルのシミュレーション結果と水質の実測値を Fig. 4(a), (b) にそれぞれ示す。

負荷上昇後 0 hr のサイクルについて、ASM3 および提案モデルによるシミュレーションを行ったところ、両者とも実測値の挙動を概ね再現できていた(Fig. 4 a)。負荷上昇直前までの窒素処理量の影響がほとんど無いため、シミュレーション結果に差が出なかったと考えられる。

一方、負荷上昇後 48 hr のサイクルにおいては、実測値から硝化反応・脱窒反応ともに 0 hr のサイクルよりも早く進行する事が確認された(Fig. 4 b)。硝化工程については、ASM3 と提案モデルによるシミュレーション結果には大きな差は認められなかった。脱窒工程において、提案モデルでは NO₃-N の減少が早く進行する状況を精度よく再現する事が可能であったが、ASM3 では NO₃-N の減少の挙動は実測値と大きくかけ離れる結果となった。提案モデルでは窒素処理量の上昇による活性の変化を再現する事ができるが、ASM3 では活性の変化が考慮されていないため、NO₃-N 還元速度が小さく見積もられることが原因と考えられる。

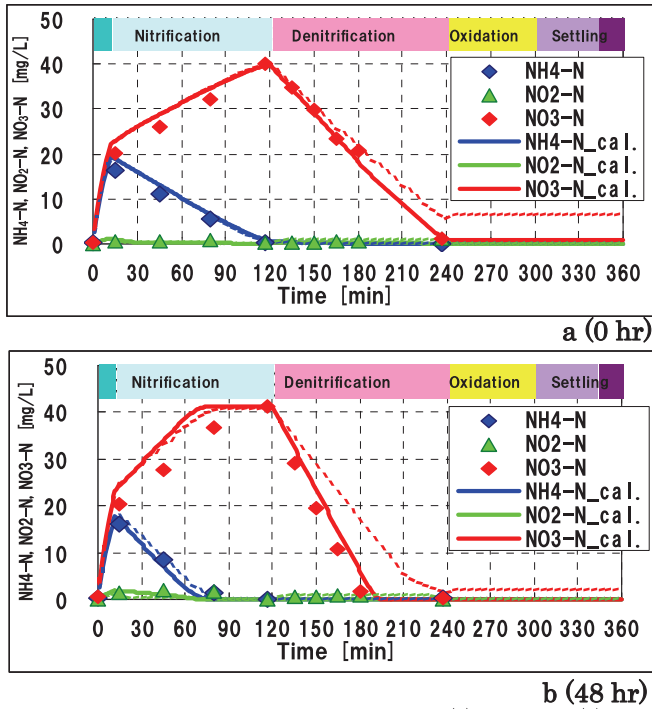


Fig. 4: Measured and calculated results : (a) after 0hr (b) after 48hr. — present proposed model ... original ASM3

4. おわりに

硝化脱窒排水処理設備において、約 2 年間にわたり細菌数の定量と最大反応速度の追跡調査を行った。その結果、細菌数あたりの窒素処理量が高い状況では、最大反応速度が大きくなるという関係が、長期間維持されていることが確認された。昨年の報告では解析できていなかった NARB に対しても、この概念が適用可能であった。本研究で示した硝化脱窒に関わる細菌の最大活性の変動を考慮した提案モデルは、反応槽内の窒素

濃度の挙動を ASM3 よりも正確に再現することが可能であった。窒素負荷が変動する場合において反応速度が大きくなる事も再現できるため、本モデルが妥当である事を確認した。

[謝辞]

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構の平成 18 年度革新技術開発研究事業により実施した。ここに記して謝意を表する。

[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) 山下哲生, 竹田尚弘, 辻幸志, 藤田昌史, 味埜俊, 赤司昭:硝化細菌の最大活性の変動を考慮した活性汚泥モデルの検討, 環境システム計測制御学会会誌, Vol. 12, No. 2, pp. 76-77 (2007)
- 3) Hermansson A. and Lindgren PE: Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2), pp. 972-976 (2001)
- 4) Harms G, Layton AC, Dionisi HM, Gregory IR, Garrett VM, Hawkins SA, Robinson KG and Sayler GS: Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2), pp. 343-351 (2003)
- 5) Throbäck IN, Enwall K, Jarvis A and Hallin S: Reassessing PCR Primers Targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* Genes for Community Surveys of Denitrifying Bacteria with DGGE, *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, pp. 401-417 (2004)
- 6) Kandeler E, Deiglmayr K, Tschierko D, Bru D and Philippot L: Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* Genes of Denitrifying Bacteria during Primary Successions of Glacier Foreland, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9), pp. 5957-5962 (2006)