亜硝酸酸化細菌の反応を例とした可逆的および不可逆的阻害現象の理論的考察

劉 兵¹・ラジブ ゴエル²・寺嶋 光春¹・安井 英斉^{1*}

¹北九州市立大学国際環境工学部エネルギー循環化学科 (〒808-0135 福岡県北九州市若松区ひびきの1-1)

² Hydromantis Environmental Software Solutions Inc. (Suite 1601, 1 James Street South, Hamilton, Ontario, L8P4R5, Canada)

* E-mail: hidemari-yasui@kitakyu-u.ac.jp

生物学的排水処理システムでは、阻害物によって処理性能が影響を受けることがある。このレスポンスを表現する従来の数学モデルは、微生物の反応速度が阻害物の濃度によって直接的に定まる可逆的の反応を仮定しているケースが多く、阻害物による微生物の失活という不可逆的な現象を含めて表すことに充分でなかった。本研究では、これら2つをまとめる新たな数学モデルを考え、高濃度では毒物として働く濃度阻害性の基質である亜硝酸の生物酸化反応を例として、可逆的阻害を増殖反応、不可逆的阻害を自己死滅反応のステージにそれぞれマッピングした。開発したモデルは亜硝酸濃度が0-2,000 mg-N/Lの回分条件やSRT = 20 dの連続条件で亜硝酸の生物酸化反応を一定の精度で表現することができた。

Key Words : Activated sludge models; Kinetics; Poisoning; Recovery; Sigmoid curve

1. はじめに

生物学的硝化脱窒プロセスは、排水中の窒素成分を除去するために広く用いられている技術であり、効率化のための研究開発が盛んに行われている。特に、硝化の中間生成物である亜硝酸でアンモニアの酸化反応を停止させる「亜硝酸型硝化プロセス」は硝化のエアレーションコストをかなり削減できるため、高濃度のアンモニアが排出される有機性廃棄物のメタン発酵システムやある種の産業排水の窒素処理において注目を集めている¹⁾。このプロセスの骨子は、亜硝酸を硝酸に酸化する微生物(亜硝酸酸化細菌)の反応を何らかの方法で抑制することであり、非解離のアンモニア(NH₃)や亜硝酸(HNO₂)による阻害をはじめとして、様々な制御方法が提案されている²⁾。

一般に生物反応は、高濃度の基質や反応生成物、環境条件(pHや温度)、阻害性化学物質(界面活性剤やシアン等)によって阻害を受ける^{3,4,5,6,7,8,9,10,11)}。これらによって、代謝に関係する酵素の反応速度が低下し、時として排水処理システムの運転障害や生物相の変化が引き起こされる。酵素の生化学分野では阻害反応の表現に拮

抗阻害・非拮抗阻害・拮抗阻害の3種類が代表的に使われているものの、実際の生物処理プロセスにおいては阻害物の濃度や種類に従って、これらのような可逆的の反応(静菌作用)ではなく、成分の毒性によって不可逆的な反応(殺菌作用、失活)も起きる。この2種類の違いを区別することは、生物処理プロセスの応答を考察する上で極めて大切となる¹²⁾。

例えば、亜硝酸酸化細菌を阻害することで亜硝酸型硝化プロセスの維持を行う場合、可逆的な阻害では、その阻害物の影響が低減した時点でただちに亜硝酸酸化細菌の反応(増殖)は高まる。一方で不可逆的な阻害を与えた場合、この阻害物は亜硝酸酸化細菌を死滅させるので、たとえ阻害物が無くなっても増殖に要する時間だけ亜硝酸型硝化プロセスが維持されるはずである。そこで不可逆的阻害の反応を明らかにすることは、施設運転時の安定性を高めることに役立つ。従って、可逆的阻害・不可逆的阻害の違いは、対象微生物の排除を検討する上で工学的な鍵と位置付けられる。

可逆的阻害・不可逆的阻害の特性を考慮すると、これら2種類をプロセス反応として表現するためには、それぞれを以下のように置けばよい。

可逆的阻害：微生物の増殖反応とリンク（式 1(a)は非拮抗阻害型の場合）

$$\text{Specific Growth Rate, } \mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \times \prod_{j=1}^k I_j = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \times I_1 \cdots \times I_j \cdots \times I_k \quad 1(a)$$

不可逆的阻害：微生物の死滅反応とリンク

$$\text{Specific Decay Rate, } b_{\text{tot}} = b_D + \sum_{j=1}^k k_j \cdot I_j = b_D + (k_1 \cdot I_1) \cdots + (k_j \cdot I_j) \cdots + (k_k \cdot I_k) \quad 1(b)$$

ここで、 μ : 比増殖速度 (d^{-1}), $\mu_{\max}$: 最大比増殖速度 (d^{-1}), K_S : 基質 S の半飽和定数 (mg-S/L), S : 基質濃度 (mg-S/L), j : 阻害物の名称 (番号), I_j : 阻害物 j の濃度依存性関数 ($0 \leq I \leq 1$), b_{tot} : 不可逆的阻害を含めたオーバーオール比自己消化速度 (d^{-1}), b_D : 通常の比死滅速度 (自己消化速度) (d^{-1}), k_j : 阻害物 j による比死滅速度 (死滅確率) (d^{-1})

定義上、微生物の比増殖速度は最大比増殖速度を超えることは無いので、可逆的阻害を含む増殖反応の速度はゼロから $\mu_{\max}$ の間をとる。一方、微生物の死滅は基本的には確率的に発生するので、不可逆的阻害を含むオーバーオールの死滅反応はそれぞれの死滅確率の和になるはずである。そのため、増殖反応・死滅反応とそれぞれリンクする阻害を含むプロセス反応は、式 1(a)、1(b)のようにそれぞれ書き直すことができる。なお式 1(a)は、活性汚泥モデル(ASMs)や嫌気性消化モデル(ADMI)で用いられている簡便な非拮抗阻害型の反応を当てはめた場合である。これは、脱窒に対する酸素の阻害やメタン生成古細菌に対するアンモニアの阻害等を表現するもので、阻害物濃度に依存する関数 I が ($= K/(K + S)$) が 0 から 1 の間をとって元の比増殖速度に掛けられている^{13, 14)}。拮抗阻害と不拮抗阻害の場合は Monod 式中の ($S/(K_S + S)$) または K_S に係数 I を掛けるものの、原理的には、可逆的阻害は掛算型、不可逆的阻害は加算型の表現で整理される。

ところで、亜硝酸は、亜硝酸酸化細菌の基質のみならず、阻害剤としても働く²⁾。Jubany *et al.* (2005)は亜硝酸による亜硝酸酸化細菌の阻害を通常の拮抗型反応（可逆的）で表したが、Liu *et al.* (2011)は高濃度の亜硝酸に曝露された亜硝酸酸化細菌は徐々に不可逆的に失活することを報告した^{15, 16)}。二人の実験結果が異なった理由は実験系に加えた亜硝酸濃度の違いや曝露時間に起因すると考えられるが、このようなケースでは、上の 2 つの式のどちらに阻害反応を加えるべきであるか、直ちに判断することは難しい。しかしながら、生物分解可能な阻害剤であれば基本的にはその物質は基質かつ阻害剤として働くため、この問題は亜硝酸に限らず、阻害剤の作用（可逆的阻害・不可逆的阻害）を考察する上で避けられない検討事項である。

阻害の表現に関わるもう一つの問題は、微生物活性の回復を表す手法である。Speece (1996)は、阻害物の曝露において活性がゆっくり回復する場合(slow adaptation)と、急速に回復する場合(quick recovery)の 2 つを区別し、前者

を元と異なる微生物種の増殖によるもの、後者を元の微生物における細胞内の適応と仮定した¹⁷⁾。Slow adaptation の場合は、新たな第 2 の微生物を仮定することでプロセスの応答をたやすく説明できるが、活性が急速に回復することを表現するコンセプトは、従来から使われている非拮抗阻害・拮抗阻害・不拮抗阻害等に含まれていない。これらの式 ($I = K/(K + S)$) には時間のファクターが無いため、阻害物の濃度が下がった時点で直ちに活性が回復することになってしまうのである。

これら 2 つの問題を理論的に考察するために、本研究では亜硝酸酸化細菌を試料として亜硝酸(HNO_2)とアンモニア(NH_3)の阻害応答に関する実験を行い、可逆的・不可逆的阻害の表現方法を検討した。研究の第 1 ステップでは、これら 2 種類の阻害を表す骨子となる一般式（スイッチング関数）を演繹的に考え、次に、亜硝酸やアンモニアに短時間で回分的に曝露した亜硝酸酸化細菌の阻害パターンを前述の Jubany *et al.* (2005)が行ったような従来の可逆的阻害の式で整理した。続く第 3 ステップとして Liu *et al.* (2011)が行ったような長時間の回分的曝露条件において、活性の回復・低下を可逆的阻害を含む一般式で表すことを試みた。そして最後に、WERF のベンチマーク報告書（250 日の連続運転における硝化の挙動）を元にこの式を用いて報告書データのシミュレーションを行うとともに、亜硝酸酸化細菌に対する亜硝酸やアンモニアの阻害閾値について広く引用されている Anthonisen *et al.* (1976)の結果とも比較した^{2, 18)}。

この実験では、基質と同時に阻害剤となる亜硝酸に着目できることに加えて、アンモニア酸化と異なり、亜硝酸の酸化前後でプロトン(H^+)が生成しないので、反応で pH がほとんど変化しない。そのため、実験操作や解析が簡便となるメリットも有する。

2. 阻害式の作成ならびに実験方法

(1) 一般スイッチング関数の作成

濃度依存性の生物反応を表現するために従来から広く

使われている Monod 式は、双曲線型のスイッチング関数 (= 定数 $\times(S/K_S + S)$) である。そこで、本研究では双曲線の式をシグモイド型に一般化し、これを各反応の基本式と置くことにした。この一般スイッチング関数(Global switching function)は式 2 のような構造を持ち、式の係数 n が 1 の時は通常の Monod 式の形になる。また、 n が大きい値の時は図-1 で示すように半飽和定数 A の近辺でグラフは大きく変曲する。

$$f = \frac{C^n}{A^n + C^n} \quad 1 - f = \frac{A^n}{A^n + C^n} \quad 2$$

ここで、 f : 一般スイッチング関数 ($0 \leq f \leq 1$)、 C : 成分濃度 (mg-C/L)、 A : 半飽和定数 (mg-C/L)、 n : 係数 (-)

図-1 一般スイッチング関数のパターン

(2) 可逆的障害からの回復表現

障害からの時間的回復は、障害項 I の影響が時間とともに徐々に減少 ($I \rightarrow 1$) することで表せば良い。この回復は、障害物の濃度が高いと遅くなることが考えられるため、時間 t と障害物濃度 S を式 3 のように組み合わせた (非拮抗型の場合)。この障害項 I は、前述の式 1(a) に対応する。また、関数 g と I は、いずれも一般スイッチング関数 f と同じようなシグモイド型を骨格としている。

$$\begin{cases} g_j = \left(\frac{S_j^n}{(K_{T,j} \cdot t)^n + S_j^n} \right) \\ I_j = \left(\frac{K_{I,j}}{K_{I,j} + S_j \times g_j} \right) \end{cases} \quad 3$$

ここで、 g : 可逆的障害のスイッチング補助関数 ($0 \leq g \leq 1$)、 j : 障害物の名称、 K_T : 障害回復の半飽和速度定数 (mg-

S/L/d)、 t : 時間 (d)、 S : 障害物濃度 (mg-S/L)、 n : 係数 (-)、 I : 障害のスイッチング関数 ($0 \leq I \leq 1$)、 K_I : 障害物の半飽和定数 (mg-S/L)

障害項 I の補助関数 g は、 $t=0$ において $g=1$ (従って、 I は元の障害 (= $K_I/(K_I + S)$) のまま、 μ を引き下げる) となり、 $t=\infty$ において $g=0$ (従って、 $I=1$ となり、 I が μ を引き下げる影響は消滅する) 性質を有する。

また g の係数 K_T は、速度の次元 (mg-S/L/d) を持つことになる。この値が高いことと t が大きいことは同義なので、高い K_T を有する障害剤は、微生物の活性が早く回復するような物質であることになる。つまり、 K_T は対象の障害物 S からの微生物活性が回復する比速度を意味する。一方、障害物 S の濃度が高い場合では、時間 t が長くなっても g はゼロに近づきにくい。これによって、障害物の濃度が高い時に $I \approx 1$ に要する時間がかかることを導くことができ、障害回復のスピードが濃度に左右されることの表現が可能になる。

(3) 不可逆的障害の表現

不可逆的障害は、その物質の存在によって活性な微生物の死滅 (活性の消滅) が起きる現象として定義することができる。一方、基質かつ障害剤として働く物質については、不可逆的障害が顕著になる閾値の濃度を想定することが簡便な表現につながる。そこで、前述の式 1(b) における障害項 I を式 (4) のように表した。定数 K_I は、その障害物によって不可逆的障害が起きる最大確率 k に関して、その 50% の頻度で事象を発生させる障害物濃度を示す半飽和定数である。係数 n を十分に高く設定すると、前述の図 1 ($n=5$) のように K_I の前後で g は 0% $\leftrightarrow$ 100% で階段状に急変する。明確な閾値濃度が存在する物質には、このようにして閾値 (K_I) を考えれば良い。

$$\begin{cases} g_j = \left(\frac{S_j^n}{K_{I,j}^n + S_j^n} \right) \\ k_j \cdot I_j = k_j \cdot g_j \end{cases} \quad 4$$

ここで、 g : 不可逆的障害のスイッチング補助関数 ($0 \leq g \leq 1$)、 j : 障害物の名称、 K_I : 不可逆的障害の半飽和濃度 (mg-S/L)、 S : 障害物濃度 (mg-S/L)、 n : 係数 (-)、 k : 比死滅速度 (d⁻¹)、 I : 障害のスイッチング関数 ($0 \leq I \leq 1$)

(4) 亜硝酸酸化細菌の集積培養

硝化・脱窒の浸漬膜式活性汚泥プロセスを適用している北九州市立大学の排水処理施設から種汚泥を採取し、水道水で希釈した人工無機排水 (NaNO₂: 500 mg-N/L, NH₄Cl: 1.0 mg-N/L, KH₂PO₄: 0.13 mg-P/L, Na₂HPO₄: 1.67 mg-

P/L)を 100 日の SRT に設定した活性汚泥装置に通水し、亜硝酸酸化細菌を主体とする硝化汚泥を集積した。装置の運転条件を HRT=50 日、DO=5 mg-O₂/L 以上、pH=7.3、水温 = 35 ± 0.5 °C に設定し、運転開始から 240 日後に汚泥を採取して一連の回分実験に供試した。

(5) 障害物の短期曝露試験

活性汚泥装置から採取した硝化汚泥に含まれる亜硝酸濃度が無視できるほど低いことを確認した後、液の DO 濃度が 20 mg-O₂/L になるようあらかじめ酸素ガスで瞬間的な曝気をおこなった。そして、50 mg-N/L ~ 1,200 mg-N/L の範囲で亜硝酸ナトリウムをそれぞれ加えた複数のフラスコによって、試薬を添加してから 15 分後に硝化汚泥の酸素吸収速度(OUR)を DO 計 (TOX-99B, 東興化学製作所)を用いて 35°C、pH = 7.5 の条件で回分的に測定し、 $t \approx 0$ における式(1a)の可逆的障害に関わるパラメータ (K_i ならびに K_S)を求めた。また、これら亜硝酸ナトリウムだけを添加した実験に加えて、亜硝酸性窒素と同濃度のアンモニア性窒素(NH₄Cl)を同時に添加した回分実験も行い、アンモニアによる障害度合いも求めた。

一方、亜硝酸酸化細菌が摂取する基質 (亜硝酸)は、解離型の亜硝酸イオン(NO₂⁻)、非解離型の亜硝酸(HNO₂)あるいは両方であるのか、今まで明確に報告されていないようである。このため、本研究では亜硝酸酸化細菌は両方(Total nitrite, $S_{NO2} = NO_2^- + HNO_2$)を区別無く摂取すると仮定し、これに基づいて基質の親和定数($K_{S, NO2}$)を計算した。

(6) 障害物の長期曝露試験

6連式の呼吸速度計(AER-8, Challenging Systems Inc.)を用い、短期曝露試験と同様に回分式活性汚泥装置から採取した硝化汚泥に 0 mg-N/L, 125 mg-N/L ~ 2,000 mg-N/L の範囲で亜硝酸ナトリウムを加えた複数の培養瓶によって、OUR を 1 時間に一回の頻度で 10 日間に亘って連続的に測定した。この測定は培養瓶の DO 濃度をほぼ飽和濃度に設定した以外は、集積培養・短期曝露試験の条件 (35°C、pH=7.5) と同条件で実施した。また、短期曝露試験と同じく、亜硝酸性窒素と同濃度のアンモニア性窒素(NH₄Cl)を添加した実験も行った。

そして、呼吸速度計で得られたレシピログラム (OUR vs. time) を元に、プロセスシミュレータ GPS-X (Hydromantis Environmental Solutions Inc.)を用い、Kappler *et al.*, (1992)ならびに Henze *et al.* (2000)の式(5)に従って、式 1(a), 1(b), 2, 3, 4 に関わる一連のパラメータを求めた^{19,20)}。実験期間中の培養瓶中の残存亜硝酸性窒素濃度は、延べの酸素吸収をもとに酸化分解された亜硝酸を計算し、初発濃度から差し引くことで求めた。また、アンモニア性窒素

は、集積した硝化汚泥のアンモニア酸化活性が無視できるほど小さかったことから、実験期間中は初発濃度を維持するものと仮定した。

亜硝酸酸化細菌のバイオマス濃度 X_B とその比自己死滅速度 b_d は、亜硝酸ナトリウムを添加しないブランク試験によって求め、それぞれ 44 mg-COD/L、0.08 d⁻¹ の値が得られた。この b_d の値が文献で報告されている範囲内(0.08-0.22 d⁻¹)であったことと、SRT に対して十分な運転日数を経た後に硝化汚泥を実験に供試したことを考慮し、硝化汚泥中には目的通り亜硝酸酸化細菌が集積したと見なした²¹⁾。なお、式のパラメータ数がかかなり多いため、本研究においては感度解析によってそれぞれの数値の確からしさを検証することは行わず、理論的に導いたこれらの式によるレシピログラムの再現性だけに焦点を当てた。

Oxygen Uptake Rate, OUR

$$= \frac{1.14 - Y}{Y} \mu X_B + (1 - f_U) b_{tot} X_B \quad 5$$

ここで、OUR: 微生物 X_B の酸素吸収速度 (mg-O₂/L/d), Y : 微生物 X_B の収率 (g-COD/g-COD), μ : 微生物 X_B の比増殖速度 (障害含む) (d⁻¹), f_U : 微生物 X_B の自己消化に伴う不活性残渣の生成比率 (= 0.2, -), b_{tot} : 微生物 X_B の比自己死滅速度 (障害含む), X_B : 微生物濃度 (mg-COD/L)

本実験では、亜硝酸だけをエネルギー源として供給して 240 日間の集積培養をおこなった後の汚泥を用いたため、立ち上げの種に用いた活性汚泥に含まれていた他の従属栄養細菌は、実験開始時点でほぼ死滅していると考えた。一方、集積培養の汚泥には、亜硝酸酸化細菌の自己消化産物から生育する微生物がわずかに存在しているはずで、ブランクの OUR から得たバイオマス濃度 X_B (88 mgCOD/L)にはこれらも含まれる。ただし、本研究はパラメータの算出そのものよりもモデル構造 (OUR の形状再現) の検討に力点を置いていることと、このような Cryptic growth によるバイオマスは亜硝酸酸化細菌よりも無視できるほど少ないと思われることを考慮し、以降の解析においてはその他のバイオマスの寄与を無視した。

(7) 非解離の亜硝酸・アンモニア濃度の計算

亜硝酸やアンモニアの障害は、非解離の成分(Free Nitrous acid (HNO₂, FNA), Free Ammonia (NH₃, FA))によって起きると言われている²⁾。そこで、これらの濃度を以下の式(6)と式(7)によってそれぞれ導いた。

$$\text{HNO}_2 = \left(\frac{H^+}{K_{a,\text{Nitrite}} + H^+} \right) (\text{NO}_2^- + \text{HNO}_2)$$

$$= \left(\frac{H^+}{K_{a,\text{Nitrite}} + H^+} \right) \cdot \text{Total Nitrite}$$

$$\text{NH}_3 = \left(\frac{K_{a,\text{Ammonia}}}{K_{a,\text{Ammonia}} + H^+} \right) (\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+)$$

$$= \left(\frac{K_{a,\text{Ammonia}}}{K_{a,\text{Ammonia}} + H^+} \right) \cdot \text{Total Ammonia}$$

ここで、 K_a : 平衡定数 (mg/L), H^+ : 水素イオン濃度 (mol/L)

非解離と解離を合わせた全濃度 (Total Nitrite, total Ammonia) を比色法によって求め、35°C の条件における非解離型亜硝酸の $pK_{a,\text{Nitrite}}$ ならびに非解離型アンモニアの $pK_{a,\text{Ammonia}}$ の値に 3.24、8.95 の文献値をそれぞれ用いて、非解離の亜硝酸・アンモニア濃度である FNA と FA の濃度を計算した²⁾。

実験においては、曝露試験の前後で pH を測定し、ほぼ同じであることを確認した。pH があまり変化しなかった理由は、実験に用いた亜硝酸化細菌主体の汚泥が通常の活性汚泥よりも自己消化が少なく、また試験の汚泥濃度も低かったため、自己消化産物由来のアンモニアによる pH の上昇はほとんど無かったことがその一因と考えられる。

3. 実験結果

(1) 短期曝露試験による酸素吸収速度の応答

短期曝露試験によって得られた硝化汚泥の酸素吸収速度 (OUR) の応答を図-2 に示した。亜硝酸ナトリウムだけを添加した実験 (■) では、約 100 mg-N/L の亜硝酸濃度 (Total nitrite) で OUR は最大の 8.8 mg-O₂/L/d を示し、高濃度の亜硝酸濃度条件であるほど低い OUR が得られた。特に、初発の亜硝酸濃度が 1,200 mg-N/L の条件では、最大 OUR の 50% ほどの値しか示さず、典型的な濃度阻害の応答が認められた。OUR の応答は、非拮抗阻害型 (太線 —) でも拮抗阻害型 (細線 -) のいずれでも近似でき、基質の親和定数 (K_{S,NO_2}) をこれらで同じ値を用いてかまわないようであった。図-2 に示したこれらのグラフは、それぞれのパラメータに $K_{I,\text{FNA}}$ (非拮抗阻害型) = 0.0107 mg-N-FNA/L, $K_{I,\text{FNA}}$ (拮抗阻害型) = 0.0107 mg-N-FNA/L, $K_S = 35 \text{ mg-N-S}_{\text{NO}_2}/\text{L}$ を用いて作成した。

図-2 短期曝露試験によって得られた OUR の応答

■: 亜硝酸のみ添加; ▲: 亜硝酸とアンモニアを同窒素濃度で添加; —および---: 非拮抗阻害型のパターン; —および---: 拮抗阻害型のパターン

また、亜硝酸ナトリウムに加えて塩化アンモニウムを加えた実験 (▲) では、最大の OUR は亜硝酸ナトリウムだけを添加した値よりわずかに低くなり、添加濃度を高めるに従い、OUR の低下は顕著になった。これは亜硝酸に加えてアンモニアの阻害が影響したことによると考えられる。

アンモニアによる阻害度合いも、亜硝酸の結果と同じように非拮抗阻害と拮抗阻害のいずれでも説明できるようであった。それぞれのグラフは、アンモニアの阻害パラメータに $K_{I,\text{FA}}$ (非拮抗阻害型) = 26.5 mg-N-FA/L, $K_{I,\text{FA}}$ (拮抗阻害型) = 6.6 mg-N-FA/L として図-1 に示した。

非拮抗阻害と拮抗阻害のいずれでも短期曝露による応答を表現できたことから、以降の解析では、式の構造が比較的簡単な非拮抗阻害型を用いて検討を進めることにした。

(2) 長期曝露試験による酸素吸収速度の応答

長期曝露試験によって得られた OUR の応答とそのシミュレーション結果を図-3 に示した。亜硝酸ナトリウムのみを添加した系 (○) ならびに塩化アンモニウムも添加した系 (▲) のいずれも、亜硝酸ナトリウムを 2,000 mg-N/L で添加した条件以外は、試薬添加直後の低い OUR は 0.2-2 日ほどピークを示し、以降は次第に減少した。

最大の OUR (グラフのピーク) に達する時間は、初発の亜硝酸 (およびアンモニア) 濃度が高いほど遅れる傾向を示した (初発濃度 125 mg-N/L の亜硝酸添加系 (A): ピーク時間 = 0.2 日、250 mg-N/L の系 (B): ピーク時間 = 0.5 日、500 mg-N/L の系 (C): ピーク時間 = 1.5 日、1,000 mg-N/L の系 (D): ピーク時間 = 2 日、2,000 mg-N/L の系 (E): ピーク時間不検出)。

図3 長期曝露試験によって得られた OUR の応答とそのシミュレーション

初発亜硝酸濃度：A=125 mg-N/L, B=250 mg-N/L, C=500 mg-N/L, D=1,000 mg-N/L, E=2,000 mg-N/L, F=なし

○: 亜硝酸ナトリウムのみの添加, ▲: 亜硝酸ナトリウムと同濃度のアンモニア性窒素を添加

太線—: 亜硝酸のみの添加した系のシミュレーション

細線—: 亜硝酸とアンモニアを添加した系のシミュレーション

特に高濃度の亜硝酸を添加した実験 (2,000 mg-N/Lの系(E)) では、OURは上昇すること無く一貫して減少し、明らかな不可逆的阻害が認められた。アンモニアについても、この添加によってOUR上昇は更に遅れ、高濃度の添加によってOURの一貫した減少 (不可逆的阻害) が強まることが認められた。

通常の可逆的阻害の式では、阻害物 (基質) の濃度低下に従って0.15 dまでのOURの計算カーブは図4に示したように時間とともに急 (「J」の形) になり、続いて阻害物 (基質) の濃度減少に従って急減する数学的特徴を有する。また、微生物の増殖が起きると、この傾きは更に急になる。これに対し、本実験で得られたOURの初期プロットは逆向きの傾向を示し、時間とともに頭打ち (「J」の形) になった。従って、初期におけるOURの上昇は、従来に考えられていた阻害物濃度の低下 (可

逆的阻害の減少) や微生物の増殖によるだけでは全く説明できず、前述の式(3)で示したような阻害回復現象の表現 (経過時間とともに阻害項が変えるための補助関数 g の導入) をシミュレーションに加える必要があった。これによる非解離の亜硝酸ならびに非解離のアンモニアが与える阻害とその回復について、式8のようにまとめた。

図4 典型的な可逆的阻害基質の応答

高濃度の亜硝酸ナトリウムを添加した条件 (1,000 mg-N/Lならびに2,000 mg-N/L) では、OURは低濃度添加(125 mg-N/L)の条件で認められたピークの13 mg-O₂/L/hに達すること無く、次第に低下した。これは、高濃度の阻害物が亜硝酸の生物酸化反応を不可逆的に引き下げると考えることで説明できる。このことを式9で表現した。式の阻害項 I においては、前述の式4のように阻害の閾値濃度を定義する必要がある。この値は本研究の実験方法では明確に求めることができないので、便宜的に、短期曝露試験で得られた高濃度によってOURが減少する条件 (1.1 mg-N-FA/L,ならびに0.004 mg-N-FNA/L) を非解離の亜硝酸と非解離のアンモニアによる阻害の閾値濃度とそれぞれ仮定した。

シミュレーションでは、 k_{FNA} :FNAによる比死滅速度 (死滅確率)、 k_{FA} : (FAによる比死滅速度 (死滅確率) をそれぞれ0.4 d⁻¹、0.05 d⁻¹と一定値にすることでOURの変化をほぼ再現することができた。このことは、可逆的阻害からの回復と異なり、不可逆的な失活における死滅の係数が時間にあまり依存しないことを意味する。これは、可逆的阻害と不可逆的阻害の生理学的メカニズムがかなり異なることを示唆している。

ここで、回分条件における微生物の死滅確率は、複雑な装置の故障 (寿命) を表すために使われるWeibull分布で一般化することができる^{23, 24, 25, 26}。これを式10に示した。この中の $r_{Decay}/X_{B(0)}$ は、初発微生物基準における時間あたりの死滅確率(d⁻¹)を示す。

微生物が単純な1次反応 (死滅確率が一定で、死

滅速度は微生物濃度のみに比例) によって自己消化 (自己死滅) する場合、式10の係数 m は、 $m = 1$ となる(= $b \cdot e^{-bt}$)。一方、阻害物によって微生物が徐々に弱り、次第に死滅確率が上昇するような場合は、Weibull分布では $m > 1$ で表すことになる。FNAやFAの阻害による比死滅速度を一定値で表現できたことは、これらによる殺菌が系の微生物に対してランダムかつ一定頻度で起きていることを示している。

このため、連続運転の生物学的排水処理システムでこの不可逆的阻害が与える影響をたいへん考察しやすくなる。なぜなら、微生物 X_B の死滅確率が曝露時間で変化する

場合、連続運転のシステムでは、システム内で新たに増殖した X_B と以前から存在する X_B にそれぞれの年齢を与え、年齢分布によって微生物全体の「弱り度合い」を考えなければならないためである。このようなケースでは、数値計算においては、もはや微生物は X_B という1つの状態変数として表すことはできず、増殖したてで阻害物にあまり曝露されておらず失活しにくい X_B 、中くらいの年齢の X_B 、曝露時間が長く老いて失活しやすい X_B ...というように無数の状態変数を定義しなければならない。

$$\begin{aligned}\mu &= \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S_{NO2}}{K_{S,NO2} + S_{NO2}} \right) \times I_{FNA} \times I_{FA} \\ &= \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S_{NO2}}{K_{S,NO2} + S_{NO2}} \right) \cdot \left(\frac{K_{I,FNA}}{K_{I,FNA} + S_{FNA} \cdot g_{FNA}} \right) \cdot \left(\frac{K_{I,FA}}{K_{I,FA} + S_{FA} \cdot g_{FA}} \right)\end{aligned}\quad 8$$

ここで、 μ : 比増殖速度 (d^{-1})、 $\mu_{\max}$: 最大比増殖速度 (d^{-1})、 S_{NO2} : 非解離・解離の全亜硝酸濃度 (mg-N/L)、 $K_{S,NO2}$: 全亜硝酸基準の半飽和定数 (mg-N/L)、 I_{FNA} : 非解離の亜硝酸(FNA)による濃度依存性関数 ($0 \leq I_{FNA} \leq 1$)、 I_{FA} : 非解離のアンモニア(FA)による濃度依存性関数 ($0 \leq I_{FA} \leq 1$)、 $K_{I,FNA}$: FNAによる半飽和定数 (mg-N/L)、 S_{FNA} : FNA濃度 (mg-N/L)、 g_{FNA} : FNAによる可逆的阻害のスイッチング補助関数 ($0 \leq g_{FNA} \leq 1$)、 $K_{I,FA}$: FAによる半飽和定数 (mg-N/L)、 S_{FA} : FA濃度 (mg-N/L)、 g_{FA} : FAによる可逆的阻害のスイッチング補助関数 ($0 \leq g_{FA} \leq 1$)

$$\begin{aligned}b_{tot} &= b_D + k_{FNA} \cdot I_{FNA} + k_{FA} \cdot I_{FA} \\ &= b_D + k_{FNA} \cdot g_{FNA} + k_{FA} \cdot g_{FA}\end{aligned}\quad 9$$

ここで、 b_{tot} : 不可逆的阻害を含めたオーバーオール比自己死滅速度 (d^{-1})、 b_D : 通常の比自己死滅速度 (d^{-1})、 k_{FNA} : FNAによる比死滅速度 (死滅確率) (d^{-1})、 I_{FNA} : FNAによる濃度依存性関数 ($0 \leq I_{FNA} \leq 1$)、 k_{FA} : FAによる比死滅速度 (死滅確率) (d^{-1})、 I_{FA} : FAによる濃度依存性関数 ($0 \leq I_{FA} \leq 1$)、 g_{FNA} : FNAによる不可逆的阻害の閾値を示すスイッチング補助関数 ($0 \leq g_{FNA} \leq 1$)、 g_{FA} : FAによる不可逆的阻害の閾値を示すスイッチング補助関数 ($0 \leq g_{FA} \leq 1$)

$$\begin{cases} \frac{dX_B}{dt} = -r_{Decay} \\ \frac{1}{X_{B(0)}} \cdot r_{Decay} = m \cdot b \cdot (b \cdot t)^{m-1} \exp(-(b \cdot t)^m) \end{cases}\quad 10$$

ここで、 X_B : 微生物濃度 (mg-X/L)、 t : 時間 (d)、 r_{Decay} : 微生物の死滅速度 (mg-X/L/d)、 $X_{B(0)}$: 初発の X_B 濃度 (mg-X/L)、 m : ワイブル係数1 (-)、 b : ワイブル係数2 (d^{-1})

表-1 亜硝酸酸化細菌の増殖・死滅反応

m	Component → Process ↓	S_{NO2}	S_{NO3}	S_{O2}	X_B	X_U	Rate (mg-COD/L/d)
1	Growth	$-\frac{1}{Y}$	$+\frac{1}{Y}$	$-\frac{1.14-Y}{Y}$	+1		$\mu_{\max} \left(\frac{S_{NO2}}{K_S + S_{NO2}} \right) \times I_{FNA,1} \times I_{FA,1} \times X_B$
2	Inherent decay			$-(1-f_U)$	-1	$+f_U$	$b_D \times X_B$
3	Poisoning by FNA			$-(1-f_U)$	-1	$+f_U$	$k_{FNA} \times I_{FNA,3} \times X_B$
4	Poisoning by FA			$-(1-f_U)$	-1	$+f_U$	$k_{FA} \times I_{FA,4} \times X_B$
		Nitrite mg-N/L	Nitrate mg-N/L	Oxygen mg-O ₂ /L	Active nitrite oxidising bacteria mg-COD/L	Particulate inert mg-COD/L	$I_{FNA,1}$ and $I_{FA,1}$: see eq. 3 $I_{FNA,3}$ and $I_{FA,4}$: see eq. 4

表-2 回分実験で得られた亜硝酸酸化細菌の化学量論・動力学パラメータ(at 35 °C)

Symbol	Value	Item	Unit
Conventional parameters			
Y	0.03	Yield of NOB	g-COD/g-N-nitrite (Ostace <i>et al.</i> , 2011)
f_U	0.20	Production of particulate inert	g-COD/g-COD (Henze <i>et al.</i> , 2000)
$\mu_{\max}$	0.32	Maximum specific growth rate	d ⁻¹
K_S	35	Half-saturation coefficient on growth	mg-N-nitrite/L
b_D	0.08	Inherent specific inherent decay rate	d ⁻¹
Inhibition parameters on growth stage			
$K_{I, FNA, growth}$	0.017	Inhibition coefficient for FNA on growth	mg-N-FNA/L (Non-competitive type)
$K_{T, FNA}$	4.4×10^{-8}	Inhibition coefficient for FNA on recovery	mg-N-FNA/L/d
n	5	Power coefficient for FNA on recovery	—
$K_{I, FA, growth}$	26.5	Inhibition coefficient for FA on growth	mg-N-FA/L (Non-competitive type)
$K_{T, FA}$	4.4×10^{-5}	Inhibition coefficient for FA on recovery	mg-N-FA/L/d
$n_{FNA, growth}$	5	Power coefficient for FA on recovery	—
Inhibition parameters on decay stage			
k_{FNA}	0.4	Specific FNA poisoning decay rate	d ⁻¹
$K_{I, FNA, decay}$	0.0044	Half saturation coefficient on poisoning	mg-N-FNA/L
$n_{FNA, decay}$	5	Power coefficient on FNA poisoning	—
k_{FA}	0.05	Specific FA poisoning decay rate	d ⁻¹
$K_{I, FA, decay}$	1.1	Half saturation coefficient on FA poisoning	mg-N-FA/L
$n_{FA, decay}$	5	Power coefficient on FA poisoning	—

4. 考察

(1) WERF 連続運転データの再現

実験で得られた結果を元に、可逆的阻害・不可逆的阻害を含む亜硝酸酸化細菌の増殖・死滅を表-1 ならびに表-2 に整理した。そして、表-1 の反応構造を用い、SRT = HRT = 20 日、20 ± 2 °C のケモスタット条件で運転された WERF ベンチマークデータのシミュレーションをおこない、処理水の硝酸濃度の再現を試みた¹⁸⁾。この運転では本研究で集積した硝化汚泥の運転温度(35°C)とかなり異なるため、生育した細菌種が同じでない可能性がある。このことを考慮し、シミュレーションにおいては、表-2 の動力学パラメーターをベンチマークのデータを再現するよう、適宜調整した。また、初発の X_B 濃度は報文に記載されていないため、これもシミュレーションで試行錯誤的に求め、 $X_{B0} = 5 \text{ mg-COD/L}$ と仮定した。

図-5 の左(原水ならびに槽内の水質記録)に示したように、運転開始後 30 日まではアンモニア酸化細菌の増殖によって非解離のアンモニア濃度が徐々に減少し、それに伴い pH も低下した。この結果、槽内の亜硝酸濃度は 40~50 日後に高くなり、これとともに 100 日目まで亜硝酸もかなり蓄積した。この頃に亜硝酸酸化細菌の反応が高まり、図-5 の右で示したように処理水の硝酸濃度は急上昇した。

実験で求めた値と 10 倍以上異なっていた。このような大きな違いが得られた明確な理由は不明だが、水温が異なることで動力学パラメータが著しく異なる微生物が増殖していたと考えることで説明できる。

阻害を考えないシミュレーションでは、処理水の硝酸濃度は初期の内から急上昇する計算結果(Simulation w/o poisoning)となったが、阻害項を反応構造に加えることで、処理水の硝酸濃度を一定の精度でシミュレーションすることができた。

興味深いことに、従来の可逆的阻害(Simulation with conventional inhibition model)を用いたシミュレーションであっても、本研究で求めた不可逆的阻害(Simulation with poisoning concept)の結果と見かけが似通ったパターンが得られた。おそらく、このことが通常の可逆的阻害モデルを使って生物処理プロセスの応答を考察できるものと今まで見なされてきた原因と思われる。しかしながら、前述の図-3 で示した亜硝酸・アンモニアの高濃度添加実験のように微生物は不可逆的に失活することは明らかであり、今後はこの点を考慮に入れてプロセス制御の理解を進めていくことが大切と考えられる。本研究では OUR に着目した理論的考察をおこなったので、対象微生物の生死を生化学的に分析・定量してこのことを実験的に実証することが今後の研究課題のひとつになる。

(2) 阻害の境界

実際の生物処理システムを考慮すると、微生物の増殖速度と死滅速度が等しくなることで見かけ上は微生物が増殖しない条件を阻害の境界と定義できる。そして、非解離の亜硝酸(FNA)やアンモニア濃度(FA)は全濃度と pH で表すことができることから、表-2 のパラメータを用いて亜硝酸酸化細菌の見かけの増殖がゼロとなる阻害境界

表-3 回分実験の表-2 と異なるパラメータ(at 20 °C)

k_{FNA}	0.15 d ⁻¹	k_{FA}	0.4 d ⁻¹
$K_{I, FNA, decay}$	0.33 mg-N-FNA/L	$K_{I, FA, decay}$	11 mg-N-FNA/L

図-5 のシミュレーションに用いたパラメータで、表-2 と異なるものを表-3 にまとめた。これらは本研究の回分

を与える非解離の亜硝酸(FNA_{ni})、非解離のアンモニア(FA_{ni})を全濃度と pH の関数によって求めることができる。このことを式 11 に示した。そして、これを亜硝酸酸化細菌の阻害境界において広く引用されている Anthonisen *et al.* (1976) が整理したグラフと図-6 のように対比した²⁾。

本研究で得られたパラメータを用いると FNA の阻害境界は Anthonisen *et al.* (1976) が示した 0.2 mg-N-FNA/L よりもかなり下側に位置した。ただし、彼らと同じ 20°C ほどの条件で行われた WERF ベンチマークのシミュレーションで得られた $K_{I,FNA,deg} = 0.33$ mg-N-FNA/L の値を用いると、両者はほぼ同じになった (図示せず)。一方で FA による阻害境界はわずかに FNA が存在する条件であれば、彼らが示した境界の 1.0 mg-N-FA/L とほぼ同じようになった。この文献では硝化汚泥の反応速度が変化した点を「阻害発生の境界」と見なしているため、式 11 のような計算値 (見かけの増殖速度 = ゼロ) と直接的に比較することは難しいが、計算した境界は、おおむね文献で想定されている範囲に近かった。

Anthonisen *et al.* (1976) のグラフに対して式 11 を用いる利点は、左辺を SRT^{-1} と置き直すことで、生物処理のシス

テムから目的の微生物をウォッシュアウトさせる運転条件を直ちに求められることである。このため、各パラメータの数値の確からしさを評価し、“default 値”を検討していくことも、阻害反応を利用して生物種を制御していくために有用な技術的課題になると考えられる。

ところで、薬剤による静菌や殺菌の評価に用いられる指標である最小阻害濃度 (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) と最大耐性濃度 (MTC, Maximum Tolerable Concentration) は、見かけの比増殖速度がゼロとなって増殖が起こらない濃度 (式 11)、微生物の死滅が起きる阻害物の半飽和濃度 (式 4) の近辺とそれぞれ関連すると考えられる。しかしながら、MIC と MTC は、手順が定まったラゴ試験によって得られる値であるため、これらの式の値と常に一致するわけではないことに留意する必要がある。MIC と MTC は添加した際の初発毒物濃度をその値に用いるので、例えば亜硝酸酸化細菌の反応における亜硝酸のように、濃度が培養期間中に減少する系では、MIC と MTC は式で得られる値よりも過大に見積もられてしまう。

図-5 SRT = 20 日のケモスタット条件における WERF ベンチマークデータのシミュレーション (左: 原水ならびに槽内の水質記録, 右: 処理水の硝酸濃度)

$$\text{Marginal inhibition condition, } 0 = \mu - b_{tot} = p(S_{NO_2}, FNA, FA) = q(S_{NO_2}, S_{NH_3}, pH)$$

11

図-6 非解離の亜硝酸ならびに非解離のアンモニアによる増殖阻害境界 (左: 亜硝酸による増殖阻害の境界; 右: アンモニアによる増殖阻害の境界; プロットと点線: Anthonisen *et al.* (1976); 実線: 本研究(表-2)による)

5. 結論

亜硝酸とアンモニアの阻害に関する理論的考察を元に、可逆的阻害反応と不可逆的阻害反応を区別した。そして、亜硝酸酸化細菌を集積した硝化汚泥を用いた回分実験と既往の文献データを使って、これらの阻害反応による微生物の応答を評価した。得られた結果を以下に示す。

- 1) 可逆的阻害を微生物の増殖反応にリンクすると仮定し、時間とともに阻害度合いが減少する活性回復現象の速度式を作成した。
- 2) 不可逆的阻害を微生物の死滅反応にリンクすると仮定し、これを通常の比自己死滅速度に加算的に加えられる死滅確率として表す速度式を作成した。
- 3) 非解離の亜硝酸ならびに非解離のアンモニアが阻害に及ぼす影響を動力学的に整理することで、連続運転・回分実験のいずれでも亜硝酸酸化細菌の応答を一定の精度でシミュレーションすることができた。動力学パラメータの値は供試の汚泥でかなり異なっており、システムで増殖する微生物種によって阻害度合いが異なることが考えられた。

謝辞：本研究の一部は、文部科学省科学研究費(No. 22404003, 23658278, 22254004)にて行われた。

参考文献

- 1) Joss, A., Derlon, N., Cyprien, C., Burger, S., Szivak, I., Traber, J., Siegrist, H., Morgenroth, E. 2011. Combined Nitrification–Anammox: Advances in Understanding Process Stability. *Environ. Sci. Technol.*, 45 (22), 9735–9742.
- 2) Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S. and Srinath, E.G. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water. Pollut. Control. Fed.*, 48 (5), 835–852.
- 3) Hill, G.A., Robinson, C.W. 1975. Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1599–1615.
- 4) Hockenbury, M.R., Grady, L., C.P.L. 1977. Inhibition of nitrification-effects of selected organic compounds. *Journal WPCF.* 49(5), 768–777.
- 5) Rozich, A.F., Gaudy A.F., Adamo, P.C. 1985. Selection of growth rate model for activated sludges treating phenol. *Water Res.* 19(4), 481–490.
- 6) Nowak, O., Svardal, K. & Schweighofer, P. 1995. The dynamic behaviour of nitrifying activated sludge systems influenced by inhibiting wastewater compounds. *Wat. Sci. Technol.*, 31 (2), 115–124.
- 7) Kong, Z., Vanrolleghem, P.m Willems, P., Verstraete, V. 1996. Simultaneous determination of inhibition kinetic of carbon oxidation and nitrification with a respirometer. *Water Res.* 30(4), 825–836.
- 8) Mandoni, P., Donatella, D., Guglielmi, G. 1999. Response of SOUR and AUR to heavy metal contamination in activated sludge. *Water Res.*, 33(19), 2459–2464.
- 9) Carrera, J., Jubany, I., Carvallo, L., Chamyb, R., Lafuente, J. 2004. Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems. *Process. Biochem.*, 39, 1159–1165.
- 10) Vadivelu, V.M., Yuan, Z., Fux, C., Keller, J. 2006. The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 4442–4448.
- 11) Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Biores. Tech.*, 99, 4044–4064.
- 12) Speece, R.E. 1996. *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Press, Nashville, TN., USA.
- 13) Henze, M., Gujer, W., Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M. 2000. Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d, and ASM3. IWA Scientific and Technical Report No. 9.
- 14) Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. 2002. Anaerobic Digestion Model No. 1. IWA Scientific and Technical Report No. 13.
- 15) Jubany, I., Baeza, J.A., Carrera, J., Lafuente, J. 2005. Respirometric calibration and validation of a biological nitrite oxidation model including biomass growth and substrate inhibition. *Water Res.* 39, 4574–4584.
- 16) Liu, B., Naka, D., Jarvis, I., Goel, R., Yasui, H. 2011. A kinetic expression for the growth and decay of nitrite oxidising bacteria. *Proc. of 4th IWA-ASPIRE*, 14–17-2, 2-6/October/2011, Tokyo, Japan
- 17) Speece, R.E. 1996. *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Press, Nashville, TN., USA.
- 18) Zimmerman, R.A., Bradshaw, A.T. and Richard, D. 2004. Acclimation of nitrifiers for activated sludge treatment: a bench-scale evaluation, WERF Report: Treatment Processes (00-CTS-16ET), IWA Publishing, London, UK.
- 19) Kappeler, J., Gujer, W. 1992. Estimation of kinetics parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water. Sci. Technol.*, 25 (6), 125–139.
- 20) Henze, M., Gujer, W., Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M. 2000. Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d, and ASM3. IWA Scientific and Technical Report No. 9.
- 21) Makinia, J. 2010. Mathematical Modelling and Computer

- Simulation of Activated Sludge Systems. IWA publishing, London, UK.
- 22) Lide, D.R. 2006. CRC Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press. ISBN : 978-1-4200-9084-0.
- 23) Weibull, W. 1952. A statistical distribution function of wide application. *ASME Journal of Applied Mechanics*. 293-297.
- 24) Taylor, G.J., Stadt, K.J., Dale, M.R.T. 1992. Modelling the interactive effects of aluminium, cadmium, manganese, nickel and zing stress using the Weibull frequency distribution. *Environmental and Experimental Botany*. 32. 281-293.
- 25) Arensberg, P., Hemmingsen, V.H., Nyholm, N. 1995. A miniscale algal toxicity test. *Chemosphere*. 30 (11), 2103-2115.
- 26) Gendig, C., Domogala, G., Agnoli, F., Pagga, U., Strotmann, U. 2003. Evaluation and further development of activated sludge respiration inhibition test. *Chemosphere*. 52, 2103-2115.
- (2013. 5. 24 受付)

Models for Reversible and Unreversible Inhibitions of Biological Nitrite Oxidation

Bing LIU¹, Rajeev GOEL², Mitsuharu TERASHIMA¹, Hidenari YASUI¹

¹Faculty of Environmental Engineering, The University of Kitakyushu

²Hydromantis Environmental Software Solutions Inc.

Biological reactions often experience inhibition conditions from high concentration of substrate, reaction products or other external inhibitory compounds. The inhibitory compounds may affect the enzymatic system leading to different forms of competitive, non-competitive or uncompetitive reversible enzyme inhibition. In other situations, the concentration of inhibitory compound could result in enzyme poisoning leading to irreversible inhibition. There are several mathematical models to express reversible inhibition, however recovery/adaptation phenomenon is not well described by these models. Furthermore, the modelling approaches for unreversible inhibitions are not well developed. In this study, dynamic response of oxygen uptake rate from nitrite oxidising batch experiments were used to develop models for reversible and irreversible inhibitions. The OUR batch tests from nitrite oxidation experiments conducted for nitrite-N concentration range of 125-2,000 mg-N /L revealed that the inhibition effect of free nitrous acid (FNA) and free ammonia (FA) disappeared after several hours due to microbial adaptation from the shock loading. The OUR tests also indicated irreversible inhibition (poisoning) leading to permanent reduction in activity at higher doses of inhibitory compounds. For the reversible inhibition a time-dependent switching function was defined to express the degree of the adaptation. The irreversible poisoning phenomenon was defined as an additional first-order type decay/death process that was initiated when the inhibitory concentration exceeded the threshold level. The modified model developed from the batch experiments data was able to reasonably reproduce the effluent nitrogenous concentration in the WERF benchmark dataset of over 250 days.