

脱窒性リン蓄積細菌を利用した新しい高度排水処理プロセス

常 田 聡* 安 祚 煥* 大 道 智 孝*
 大 野 高 史* 平 田 彰*

New Biological Nutrient Removal Process Using Denitrifying Phosphate-Accumulating Organisms

Satoshi TSUNEDA*, Johwan AHN*, Tomotaka DAIDOU*
 Takashi OHNO* and Akira HIRATA*

* Department of Chemical Engineering, Waseda University, 3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

Abstract

Selective cultivation of denitrifying phosphate-accumulating organisms (DNPAOs) was conducted using a sequencing batch reactor (SBR) under different electron acceptor conditions. A new biological nutrient removal process configured with anaerobic/aerobic/anoxic conditions was successfully operated in a single SBR. The supplementation of carbon substrate at the start of the aerobic condition was effective for the simultaneous removal of phosphorus and nitrate by DNPAOs.

Key words : denitrifying phosphate-accumulating organisms, electron acceptor, enhanced biological phosphate removal, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), anaerobic/aerobic/anoxic process

1. はじめに

湖沼・内湾などの閉鎖性水域における水質汚濁の主な原因物質は、有機物と栄養塩（窒素およびリン）である。特に生活排水に含まれる栄養塩が過剰に蓄積した水域では、アオコや赤潮などのいわゆる富栄養化問題が引き起こされる。したがって、生活排水処理施設において、有機物の除去に加えて窒素およびリンも適切に除去する必要性が生じてきた。生物学的に窒素成分を除去する方法は、好気条件下での硝化細菌による硝化と無酸素条件下での脱窒細菌による脱窒から成り立つ。一方、生物学的脱リンはリン蓄積細菌を利用して行われる。このリン蓄積細菌は、嫌気条件下で有機物を用いたリンの放出、つづく好気条件下で酸素を用いたリンの取り込みを行う。このとき、リンの取り込み量が放出量を上回る性質を利用して、排水中からのリン除去が達成される。

上述の有用微生物の代謝作用を利用して有機物・窒素・リンを除去できるプロセスとして、嫌気/無酸素/好気法（いわゆるA₂O法）が下水処理施設で採用されている。しかしながら、このプロセスでは、ほとんどの有機物が嫌気条件でリン蓄積細菌によって消費されてしまい、次の無酸素条件下で有機物が不足し、脱窒能が低下するという問題点がある。特に日本の下水のように窒素成分に対する炭素成

分の比率（C/N比）が低い排水においては、有機物の不足により十分な窒素除去が達成できないという問題が生じる。また、A₂O法の場合、好気槽から無酸素槽に硝化液を循環するため、少なくとも二つの反応槽が必要となる。したがって、小規模排水処理施設に導入しやすいといわれている回分式活性汚泥槽を単独で用いて、A₂Oプロセスを実現することは原理上不可能である。

これまでリン蓄積細菌の呼吸における電子受容体は、分子状酸素であることが知られていたが、ここ数年の研究により、電子受容体として硝酸を利用してリンを取り込む、つまり脱窒能のあるリン蓄積細菌（以後、脱窒性リン蓄積細菌と呼ぶ）が存在するということがわかってきた^{1,4)}。脱窒性リン蓄積細菌の生理学的特徴をうまく利用することができれば、無炭素・無酸素条件下で脱窒およびリンの取り込みを同時に行わせることができ、新しい生物学的栄養塩除去プロセスの開発が可能になる。しかしながら、脱窒性リン蓄積細菌を高度排水処理プロセスに応用した例はなく、また単離ができないことから、その生理学的性質についてはほとんどわかっていないのが現状である。このような観点から本研究では、脱窒性リン蓄積細菌の選択的培養法を開発するとともに、単一槽で有機物・窒素・リンが除去できる新しいプロセスである嫌気/好気/無酸素（AOA）法の開発を行った。

* 早稲田大学理工学部応用化学科 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

2. 方 法

2.1 模擬下水

都市下水を模擬した排水は1lあたり以下の物質を含むように調製した。 CH_3COONa : 384.4 mg, KH_2PO_4 : 49.4 mg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 141.4 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 14 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 90 mg, 栄養液0.3 ml。栄養液は1lあたり以下の物質から成る。 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 1.5 g, H_3BO_3 : 0.15 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.03g, KI : 0.18 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.12 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.06 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.12 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.15 g, EDTA : 10 g。

2.2 培養操作

有効容積2lの回分式反応槽を用いて嫌気/好気条件 (Phase I, Phase II) および嫌気/無酸素条件 (Phase III) で培養を行った。運転操作としては、約100日間の全培養期間を通じて1サイクル8時間の工程 (原水注入20分, 嫌気条件90分, 好気または無酸素条件285分, 汚泥沈降工程60分, 処理水引き抜き工程25分) を1日3回繰り返した。原水の注入量および処理水の引き抜き量はいずれも1lとし, 水理的滞留時間 (HRT) が16時間となるようにした。また, 汚泥沈降工程直前に汚泥懸濁液を約33 ml引き抜き, 汚泥滞留時間 (SRT) が約20日となるようにした。種汚泥としては標準活性汚泥法を採用している下水処理場の返送汚泥を, 流入水としては2.1に示した模擬下水をそれぞれ用いた。全培養期間を通じてpHは6.9~7.1に調整した。

まず分子状酸素のみを利用できるリン蓄積細菌の獲得のためにアシルチオ尿素 (硝化阻害剤) を好気条件の初期に添加して嫌気/好気条件により25日間培養を行った (Phase I)。その後, 原水に (嫌気条件の初期に) 硝酸を約25 $\text{mg-N} \cdot \text{l}^{-1}$ となるように添加することにより, 分子状酸素と硝酸を両方利用できる脱窒性リン蓄積細菌の獲得を試みた (Phase II)。さらに脱窒性リン蓄積細菌がある程度まで獲得できた82日目から約50 $\text{mg-N} \cdot \text{l}^{-1}$ の硝酸を含む原水を流入させるとともに嫌気/無酸素条件に切り替え, 硝酸のみ利用できる脱窒性リン蓄積細菌の優占化を試みた (Phase III)。

2.3 リン取り込み能の評価

2.2の条件下で培養した汚泥が (a)分子状酸素を用いたリン取り込み能と(b)硝酸を用いたリン取り込み能をそれぞれの程度有しているのかを評価するため, 以下のような実験を定期的に行った。まず, Phase IおよびPhase IIでは, 好気条件下 (285分間) における回分式反応槽内のリン濃度の減少量を測定することにより(a)を算出した。また, (b)については, 嫌気条件終了直後に回分式反応槽から50 mlの汚泥懸濁液を引き抜いてフラスコに移した後, 硝酸ナトリウムを20 $\text{mg-N} \cdot \text{l}^{-1}$ となるように添加し, 285分経過する間のリン濃度の減少量を測定することにより求めた。一方, Phase IIIでは, 無酸素条件下 (285分間) における回分式反応槽内のリン濃度の減少量を測定することにより(b)を算出した。また, (a)については, 嫌気条件終了直後に回分式反応槽から50 mlの汚泥懸濁液を引き抜いてフラスコに移した後, 曝気を行って好気条件下にして, 285分経過する間のリン濃度の減少量を測定することにより求めた。

2.4 新規栄養塩除去プロセス (AOA法)

脱窒性リン蓄積細菌を利用して単一槽で窒素およびリンを除去できるプロセスを開発するために嫌気/好気/無酸素条件下で回分式反応槽 (有効容積2l) を1日3サイ

クル (1サイクル8時間, 原水注入20分, 嫌気条件90分, 好気条件90分, 無酸素条件195分, 汚泥沈降工程60分, 処理水引き抜き工程25分) で運転した。好気条件でのリンの取り込みを一時的に阻害するために好気条件の初期に少量の有機物 (酢酸ナトリウム) を加えた。その添加量は, 14~20日目は25 $\text{mg-C} \cdot \text{l}^{-1}$, 20日目以降は40 $\text{mg-C} \cdot \text{l}^{-1}$ とした。原水の流入および処理水・余剰汚泥の引き抜きは2.2と全く同様に行い, HRTは16時間, SRTは20日に制御した。種汚泥として2.2の培養法で得られた汚泥をMLSS 6000 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ となるように投入した。流入水としては2.1で示した模擬下水を用いたが, アンモニア態窒素濃度については好気条件初期の有機物の添加量や全体の処理状況を踏まえて0~14日目は30 $\text{mg-N} \cdot \text{l}^{-1}$, 14~17日目は50 $\text{mg-N} \cdot \text{l}^{-1}$, 17日目以降は45 $\text{mg-N} \cdot \text{l}^{-1}$ と変化させた。このとき1あたりの模擬下水に加えた $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の重量は141.4 mg (0~14日目), 235.7 mg (14~17日目), 212.1 mg (17日目以降) であった。pHは7.0~7.2の間に保った。本プロセスで脱窒性リン蓄積細菌および硝化細菌が優占化し, 理想的に機能を発揮した場合, 1サイクルにおける有機物・窒素・リンの濃度変化はFig. 1のようになると見込まれる。

2.5 水質分析

リンの分析は, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater⁵⁾に従った。アンモニアはカチオンカラム (CS, Dionex) を装備したイオンクロマトグラフ (DX-120, Dionex) で測定した。硝酸および亜硝酸はアニオンカラム (IC-Anion-PW, 東ソー) とUV検出器 (UV-8011, 東ソー) を装備した液体クロマトグラフで測定した。全有機炭素 (TOC) はTOCアナライザー (TOC-5000, 島津製作所) によって測定した。

2.6 PCR-DGGE法

供給する電子受容体の変化に対応した汚泥中の微生物群集構造の変化を追跡するためにPCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法による分析を行った。定期的に採取した汚泥からベンジルクロロホルム抽出キットによりDNAを抽出し, プライマー 341F-GC (CCTACGGGAGGCAGCAG) と UNIV907R

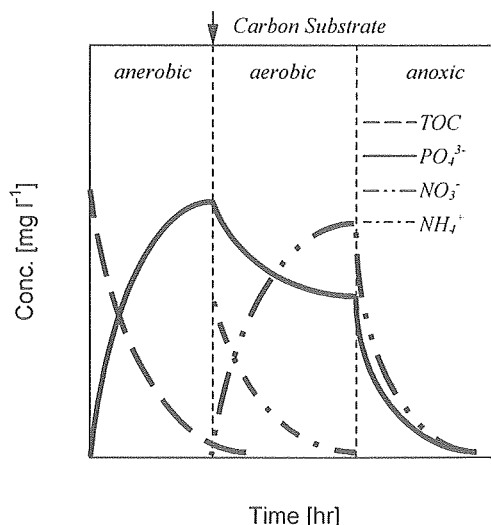


Fig. 1 Schematic diagram of simultaneous nitrogen and phosphorus removal in anaerobic/aerobic/anoxic (AOA) process

(CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT)⁶ を用いて16S rRNA遺伝子の一部のPCR増幅を行った。その後、PCR産物を変性剤濃度勾配のついたゲルに移し、60°C、130 Vで4時間電気泳動を行った。さらに泳動後、ゲルをSYBR[®] Greenで染色し、紫外線照射下でDGGEバンドを撮影した。

3. 結果および考察

3.1 脱窒性リン蓄積細菌の選択的培養

脱窒性リン蓄積細菌の優占化技術を確立するため、供給する電子受容体を変化させながら培養を行い、定期的に汚泥のリン取り込み能を追跡した。Fig. 2は分子状酸素または硝酸を用いたリン取り込み量の経日変化を示す。実験初期においてリンの取り込み能は全く見られなかったが、嫌気/好気条件下での培養 (Phase I) を行った結果、分子状酸素を用いたリンの取り込み能が徐々に増加した。これに対して、硝酸を用いたリンの取り込み能は全く現れなかった。この結果は、好気条件下でアンモニアの硝化が起こらないようにアリルチオ尿素を供給したことにより、汚泥が硝酸に曝される機会が全く無かったためと考察される。

一方、25日目から嫌気条件の初期に硝酸を供給してリンの放出および脱窒を同時に行った (Phase II)。その結果、硝酸を用いたリンの取り込み能が徐々に上昇し、80日目には分子状酸素を用いたリンの取り込み能の約50%にまで達した。Phase IIの嫌気条件における各物質の共存状態は、嫌気/無酸素/好気 (A₂O) プロセスにおける無酸素槽の状態と似ている。実際にわれわれは、A₂O法を採用している下水処理場から採取した汚泥が初めから硝酸を用いたリンの取り込み能を示すことを別途確認している⁷⁾。これらの結果を合わせて考えると、嫌気条件初期における硝酸と有機物の共存状態が脱窒性リン蓄積細菌の出現を引き起こす要因となっていることが推測される。

さらに、83日目から嫌気条件初期の硝酸供給をやめ、その代わりに嫌気条件の後に (曝気をせずに) 約50 mg-N·l⁻¹の硝酸を供給し無酸素条件を作り出した (Phase III)。つまり嫌気/無酸素条件で培養を行った。その結果、硝酸を用いたリンの取り込み能が徐々に増加する一方で、分子状酸素を用いたリン取り込み能は急激に減少した。これは、電子受容体の供給条件に従って優占化するリン蓄積細菌の種類が変わることを示唆する。以上の結果から、本研究で行った一連の培養操作 (Phase I → Phase II → Phase III) を行うことにより、活性汚泥から脱窒性リン蓄積細菌を選択的に優占化できることが示された。

3.2 微生物群集構造の変化

上記培養実験期間における微生物群集構造変化をPCR-DGGE法により追跡した。バンドパターンをFig. 3に示す。Fig. 2を見ると25日目から85日目にかけて硝酸を用いたリンの取り込み能が徐々に上昇しているにもかかわらず、Fig. 3を見ると25日目から85日目までのバンドパターンはほとんど変化していない。これは脱窒能を持たなかった一般的なリン蓄積細菌が脱窒能を持つようになったためと推測される。しかし、DGGEバンドパターンはPCR増幅のバイアスの影響も受けるので、はっきりとした理由は不明である。一方、85日目以降、電子受容体を分子状酸素から硝酸にすべて切り替えてからは、バンドパターンに大きな変化が見られた。Fig. 3のバンドAのように新たに現

れてきたものや、バンドBおよびCのように消えていったものも見られた。以上の結果は、少なくとも二種類の脱窒性リン蓄積細菌 (分子状酸素および硝酸を両方利用できる脱窒性リン蓄積細菌と硝酸のみ利用できる脱窒性リン蓄積細菌) が存在することを示唆する。しかしながら、両者の区別や同定は今のところできていない。

3.3 新規排水処理プロセスの性能評価

単一槽で有機物・窒素・リンを除去できる嫌気/好気/無酸素 (AOA) プロセスの性能評価を行うために、約1ヵ月間、回分式反応槽を運転した。嫌気、好気、無酸素条件終了時におけるリン濃度をそれぞれ経日的に測定し、Fig. 4にまとめた。また、処理水中の全窒素濃度および窒素除去率の経日変化をFig. 5にまとめた。

運転開始初期は、嫌気条件下でのリン放出量が少なく、

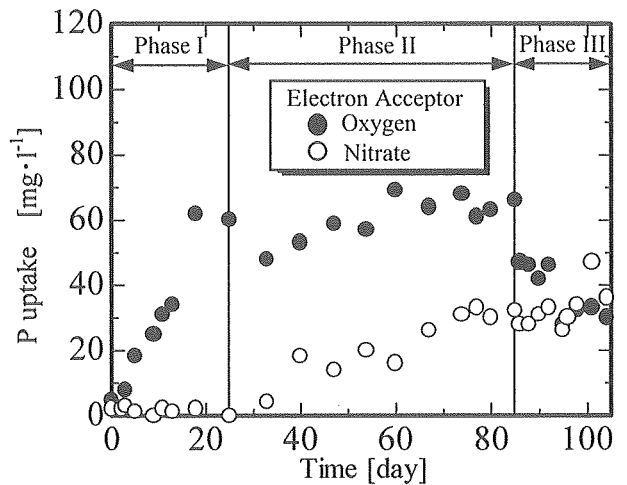


Fig. 2 Changes in the aerobic and anoxic phosphate uptake abilities of the activated sludge cultivated under each operation condition

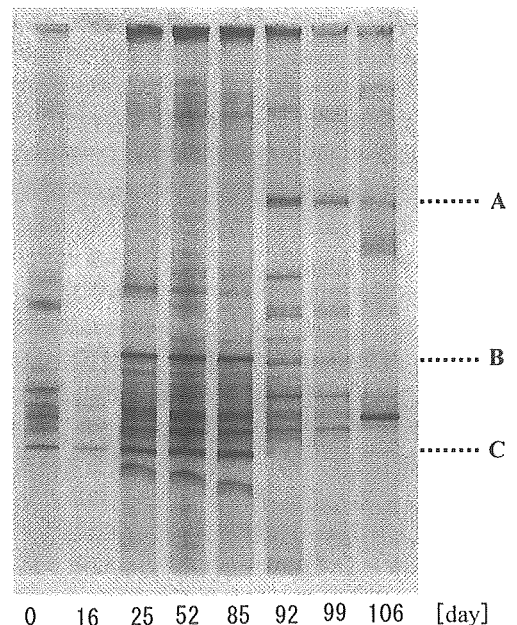


Fig. 3 DGGE band profiles of the PCR amplified products obtained from sludge samples at different days

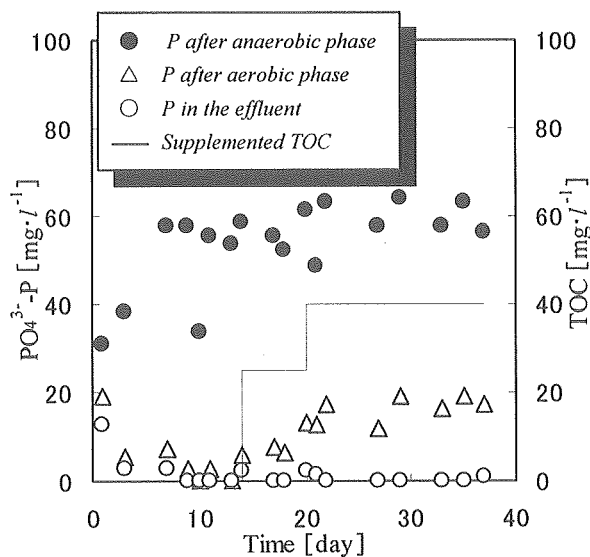


Fig. 4 Daily variations of phosphorus concentrations at the end of anaerobic, aerobic and anoxic conditions

また好気条件下および無酸素条件下でのリン取り込み量も少なかったが、時間が経つにつれリン除去能は急激に増加し、7日目にほぼ定常状態に達した。このとき、 $300 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ の有機物が嫌気条件初期に供給され、約 $60 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の嫌氣的リン放出が観察された。また、続く好気条件、無酸素条件においてそれぞれ $50.5 \text{ mg} \cdot \text{P} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $4.6 \text{ mg} \cdot \text{P} \cdot \text{l}^{-1}$ のリン取り込みが観察された。無酸素条件におけるリン取り込み量は全リン取り込み量の約8%を占めるに過ぎなかった。

7~14日目においては、好気条件でのリン取り込みが増えて好気条件終了時におけるリン濃度が極端に低下した (Fig. 4参照)。その影響を受け、続く無酸素条件において、脱窒性リン蓄積細菌が取り込むべきリンが不足し、硝酸が残ってしまった。10日目において処理水中に残存した全窒素濃度は約 $8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であった (Fig. 5参照)。

一般にリン蓄積細菌は嫌気条件で有機物を取り込んで Polyhydroxyalkanoate (以後PHAと略す) を合成し、次の好気条件でこれを分解し、そのときに得られるエネルギーを使って好気条件でリンの取り込みを行う⁸⁾。一方、電子受容体 (酸素や硝酸) と電子供与体 (酢酸) が同時に存在する際にPHAの合成およびリンの放出が起こるという既往の実験結果もある⁹⁾。これに基づいて、14日目から、好気条件初期に $25 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ の有機物 (酢酸ナトリウム) を供給し、好気条件下でのPHAの合成を引き起こし、リン取り込みを阻害することを試みた。有機物の供給に応じて、好気条件終了時におけるリン濃度は日増しに増大し、20日目には、 $13.2 \text{ mg} \cdot \text{P} \cdot \text{l}^{-1}$ に達した (Fig. 4参照)。このとき、無酸素条件下でのリン取り込み量は全リン取り込み量の22.3%に達した。一方、処理水中の全窒素濃度は日増しに減少した。これは好気条件下でのリンの取り込み量が減ったことにより、次の無酸素条件下で脱窒性リン蓄積細菌が電子受容体として硝酸を用いてリンの取り込みができるようになったためだと思われる。

20日目以降、無酸素条件下でのリン取り込み量をさらに増大させるために、好気条件初期に供給する有機物濃度を

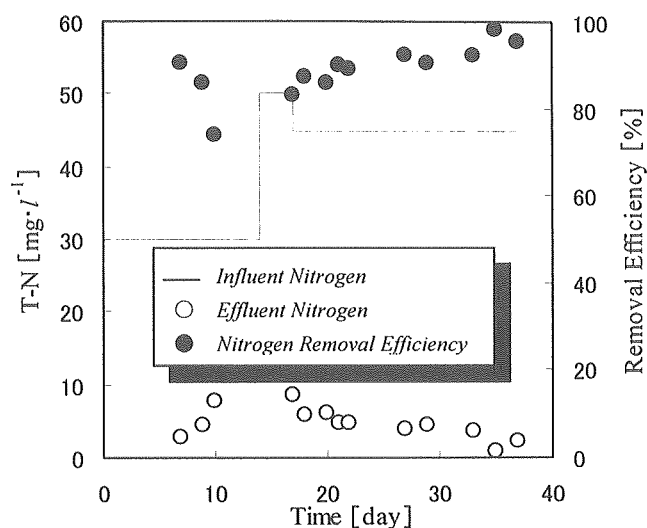


Fig. 5 Daily variations of total nitrogen concentration of the effluent and nitrogen removal efficiency

$40 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ に増やした。その結果、好気条件終了時におけるリン濃度の上昇が観察され、22日目において約 $20 \text{ mg} \cdot \text{P} \cdot \text{l}^{-1}$ に達した。このとき、無酸素条件下でのリン取り込み量は、全リン取り込み量の27.7%に達した。一方、好気条件初期における有機物添加量を $25 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ から $40 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ に変更すると処理水中の全窒素濃度はさらに減少した。なお、アンモニアは全実験期間を通じて完全に除去され、処理水中に残存した窒素成分はすべて硝酸態窒素であった (データ省略)。

次に、リンと窒素の除去率についての結果および考察を述べる。リン除去率については、好気条件初期の有機物添加の有無に関わらず、安定して80%以上を維持していた。しかしながら、好気条件終了時のリン濃度が低いときには続く無酸素条件での脱窒が起こりにくくなり、結果として窒素の除去率が80%以下に低下してしまった。好気条件初期に添加する有機物を $40 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ に増やしてからは全窒素除去率は90%以上に達した。よって、以上の結果は、脱窒性リン蓄積細菌による無酸素条件下でのリン取り込みと脱窒能力を高めるためには、好気条件初期における有機物の供給が必要であることを示している。

以上、脱窒性リン蓄積細菌の生理学的特色を活かすことのできるプロセス、すなわち嫌気/好気/無酸素 (AOA) 法を採用し、かつ好気条件初期に有機物を少量供給すれば、単一槽を用いて都市下水から有機物・窒素・リンの除去が達成できることが示唆された。

従来の脱窒細菌による処理法において、硝酸の脱窒のための有機物として酢酸を用いた場合、理論的に必要とされるC/N比は $1.25 \text{ mg} \cdot \text{C} / \text{mg} \cdot \text{N}$ であると報告されている¹⁰⁾。よって本実験で流入した $30 \text{ mg} \cdot \text{N} \cdot \text{l}^{-1}$ のアンモニア態窒素が好気条件ですべて硝酸態窒素になったと仮定すると、次の無酸素条件で通常の脱窒細菌によってこの硝酸を完全に脱窒するのに必要とされる有機物量は $37.5 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ と見積もられる。また、本研究では17日目以降、流入窒素濃度を $45 \text{ mg} \cdot \text{N} \cdot \text{l}^{-1}$ に変更しており、このときに生成するすべての硝酸を脱窒するのに必要な有機物量は $56.25 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ と見

積もられる。一方、AOA法を用いた実験で、実際に45 mg-N・ l^{-1} の窒素を除去するために好気条件で添加した有機物量は40 mg-C・ l^{-1} であった。よって、無酸素条件において有機物を添加する場合よりも、理論的には16.25 mg-C・ l^{-1} だけ少なくて済むことになる。しかしながら、有機物を添加するという手段はプロセスの操作の複雑化やコスト面で大きなデメリットとなる。好気条件でリンの取り込みを阻害する方法として有機物を添加するのは一つの有効な手段であるが、今後はそれ以外の手段を検討していく必要があると考えられる。

4. ま と め

脱窒性リン蓄積細菌を高度排水処理プロセスに応用するための基礎的検討を行い以下の成果を得た。

1) 嫌気/好気条件下での培養の際、硝酸と有機物の共存によって脱窒性リン蓄積細菌が出現し、さらに嫌気/無酸素条件で培養することにより、脱窒性リン蓄積細菌を選択的に培養できることがわかった。

2) 微生物群集構造変化をPCR-DGGE法により観察したところ、脱窒性リン蓄積細菌の発現に呼応する生態構造変化は見られなかったが、与える電子受容体を分子状酸素から硝酸にすべて切り替えると生態構造に大きな変化が見られた。

3) 嫌気/好気/無酸素 (AOA) 法を用いて模擬下水の連続処理試験を行ったところ、好気条件初期に有機物を少量供給すれば、単一槽で有機物・窒素・リンが除去できることが示唆された。

謝 辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の産業技術研究助成事業として行われた。

(原稿受付 2002年 5月 7日)

(原稿受理 2002年10月24日)

参 考 文 献

- 1) Chuang, S. H., Ouyang, C. F. and Wang, Y. B. (1996) Kinetic competition between phosphorus release and denitrification on sludge under anoxic condition, *Water Res.*, **30**, 2961-2968.
- 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**, 777-786.
- 3) Meinhold, J., Carlos, D. M. F., Daigger, G. T. and Isaacs, S. (1999) Characterization of the denitrifying fraction of phosphate accumulating organisms in biological phosphate removal, *Water Sci. Tech.*, **39**, 31-42.
- 4) Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S. and Hirata, A. (2002) Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay, *Water Res.*, **36**, 403-412.
- 5) APHA, AWWA and WEF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1992) 18th edn., Washington D.C, USA.
- 6) Amann, R. L., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. and Stahl, D. A., (1992) Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 614-623.
- 7) 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**, 442-446.
- 8) Mino, T., van Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process, *Water Res.*, **32**, 3193-3207
- 9) Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S. and Hirata, A. (2002) Transformation of phosphorus and relevant intracellular compounds by a phosphorus-accumulating enrichment culture in the presence of both the electron acceptor and electron donor, *Biotechnol. Bioeng.*, **79**, 83-93.
- 10) Glass, C., Silverstein, J. (1998) Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation, *Water Res.*, **32**, 831-839