

メタン生成流動床における生物膜の モデル化に関する研究

今井 剛¹・楠田哲也²

¹正会員 工修 山口大学助手 工学部社会建設工学科 (〒755 山口県宇部市常盤台2557)

²正会員 工博 九州大学教授 工学部建設都市工学科 (〒812-81 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1)

本研究では、生物膜の特性および生物膜内における各菌体群の分布特性を表現することを目的として、まず、多層型生物膜モデルを構築した。次に、生物膜内の各菌体の分布特性を把握するために、メタン生成流動床内の担体付着生物膜をその表層から段階的に剥離させ、その基質消費活性を測定した。この実験結果から活性菌、死滅菌に加えて新たに膜内における“休眠状態菌”の存在が実験的に確認された。さらにこの休眠状態菌を上記の生物膜モデルに導入することにより、より正確な各菌体分布の予測が可能なモデルへと改良し、実験結果と比較することによりその妥当性の検討を行った結果、本モデルにより活性菌、休眠状態菌、細胞外ポリマーの膜厚方向濃度分布をほぼ表現でき、構築したモデルの妥当性が示された。

Key Words : anaerobic condition, biofilm, dormant biomass, fluidized bed, modeling, simulation, sloughing

1. はじめに

嫌気性廃水処理法は、従来より主として下水汚泥や食品工場等の産業廃水に代表される高濃度有機性廃水の処理に適用されてきた。近年、ろ床、流動床およびUASB等の生物膜を利用したプロセスが嫌気性処理に適用され、従来の枠を越えて低濃度廃水にまで応用できるよう様々な研究が進められている^{1)~7)}。

これらの処理法の最も顕著な特長は、系内に処理を担う微生物を高濃度・高密度に保持することができ、高効率の処理を可能にしていることである。

これまでに、これらの生物膜を利用した処理プロセスの性能を評価する上で重要となる生物膜の特性や構造に関する様々な因子が明らかにされてきている⁸⁾。また、著者らは菌体量指標として従来の包括的なタンパク質濃度やVSS濃度ではなく、処理を直接担う活性をもった菌体量として“活性菌体量”を導入したモデルによって非定常な水質応答を表現できることを報告している^{9)~11)}。

しかしながら、このモデルには不活性な担体付着固形有機物量の予測に関する問題が残されていた。すなわち、生物膜が生長し、生物膜内部において不活性固形有機物の蓄積が顕著となる場合には、このモデルにより生物膜の剥離現象を表現するのは困難

であった¹¹⁾。また、生物膜内部においては活性菌体、死滅菌体、細胞外ポリマー等の濃度分布が存在することが報告されている^{12),13)}。不活性固形有機物等を含めて、このような生物膜の発達過程を精度よく予測するためには、生物膜を多層に分割して生物膜表層における剥離係数と内層における剥離係数を区別して与える必要がある。

そこで本研究は、まず生物膜のモデル化に先立って、生物膜の物理的特性のうち、モデル化に際して最も重要であると考えられる剥離強度を推定した。次に、生物膜内における各菌体群の分布特性を表現することを目的として、多層型生物膜モデルを構築した。また、生物膜内の各菌体の分布特性を把握するために、メタン生成流動床内の担体付着生物膜をその表層から段階的に剥離させ、その基質消費活性を測定した。この実験結果から活性菌、死滅菌に加えて新たに“膜内において微生物の空間競合に起因して生物学的に休眠状態にある菌”の存在について検討した。なお、この休眠状態菌とは比増殖速度が0となったものを必ずしも意味しておらず、比増殖速度をいくらか本来より低下させているものの総和を、形式的に休眠状態菌としてモデル的に表現したものである。さらにこの休眠状態菌を上記の生物膜モデルに導入することにより、より正確な各菌体分

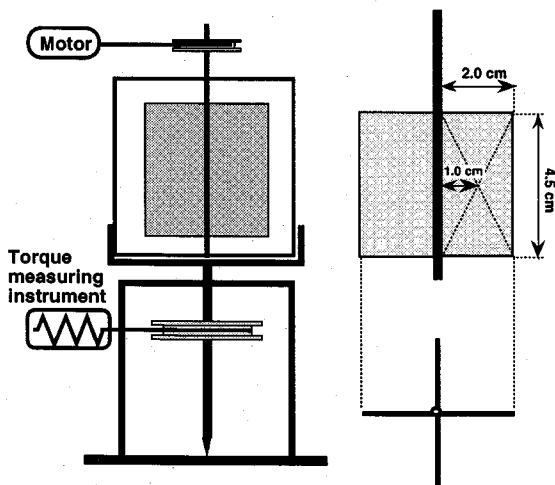


図-1 攪拌方式による生物膜剥離装置およびその攪拌翼の模式図

布の予測が可能なモデルへと改良し、実験結果と比較することによりその妥当性を検討し、本モデルの有用性について評価することを目的とした。

2. メタン生成流動床における生物膜の剥離強度の推定

前述したように、嫌気性流動床法等の付着生物膜型廃水処理において、活性菌体、死滅菌体、細胞外ポリマー等の濃度分布が生物膜内に存在する。この生物膜内の菌体分布に大きな影響を与える要因の一つが生物膜の付着強度である。つまり、付着強度が小さく剥がれ易い生物膜の場合は生物膜内に各菌体の分布は生じ難く、反対に付着強度が大きく剥がれ難い場合には分布が生じ易いと予想されるからである。ここで付着強度とは、生物膜の剥離が引き起こされる強度と定義する。生物膜の剥離の原因には生物学的、物理学的なものをはじめ、様々なものが考えられるが、その中でも最も大きな影響を及ぼすものは、流動床においては物理的な流体力であると考えられる。したがって、メタン生成流動床において定常状態まで生長した生物膜の剥離強度を測定することを目的として、生物膜の剥離装置を製作し、種々の剥離強度における剥離量を実測した。この実験結果から本流動床における生物膜の限界剥離強度を推定した。

(1) 剥離装置の概要

図-1に作製した生物膜攪拌剥離装置の概要を示す。剥離装置は寸寸が6cm×6cm×6cmの立方体で、装置内に設けた十文字形の攪拌翼により攪拌を行なう。

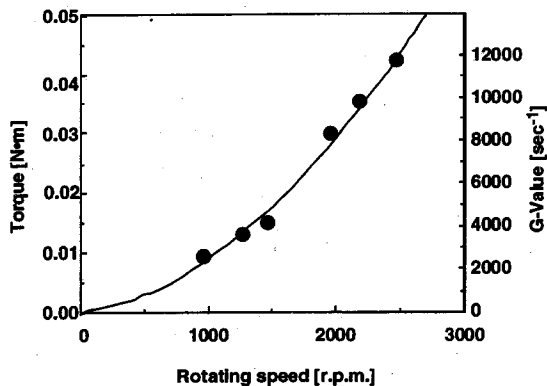


図-2 攪拌翼の回転数と装置に作用するトルクおよびG値の関係

なお、攪拌翼の回転数は可変である。また、剥離装置をトルク測定装置上に設置し、同時にトルクを測定できるようにしてある。攪拌強度の表示には式(1)で示したG値(s⁻¹)を用いた。剥離装置内においてG値の大きさは、場所により異なる。G値は攪拌翼の端部や装置内壁面近傍で大きく、それ以外のところでは小さいと考えられる。さらに、担体は攪拌を受け、この装置内を移動する。したがって、担体が受ける時間的平均としてのG値と、空間的平均のG値はおおむね異なることになる。この差異を計測することは極めて困難であるので、ここでは空間的平均のG値を攪拌強度の表示として用いた。

$$G = \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu}} \quad (1)$$

ここに、 ϵ_0 ：流体の単位体積、単位時間あたりのエネルギー=散逸率(Pa·s⁻¹)、 μ ：液体の分子粘性係数(Pa·s)である。

また、G値と剥離装置に作用するトルクの関係は以下の通りである。

$$G = \sqrt{\frac{2\pi\omega T}{\mu V}} \quad (2)$$

ここに、 ω ：攪拌翼の角速度(s⁻¹)、T：トルク(N·m)、V：攪拌槽の容積(m³)である。

剥離装置内に水を満たした状態で、回転数とトルクおよびG値の関係を実測した。図-2にその関係を示す。この結果より本実験の範囲内では、トルクおよびG値は回転数の2乗に比例することがわかる。

(2) メタン生成流動床における生物膜の限界剥離強度の推定

ある攪拌強度のもとでの攪拌継続時間と生物膜の剥離量の関係を調べるために、以下の実験を行なった。対象とした生物膜は負荷4kg-COD·m⁻³·day⁻¹で長

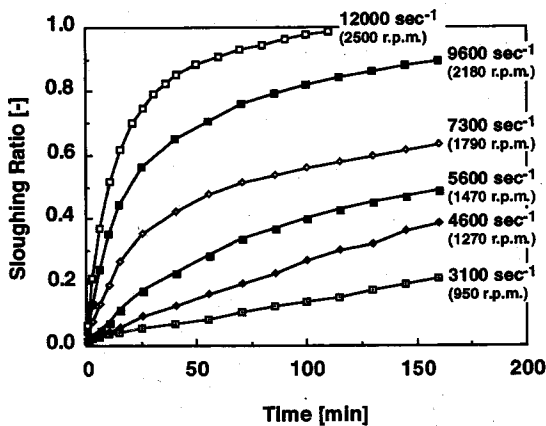


図-3 生物膜の剥離率と搅拌継続時間の関係

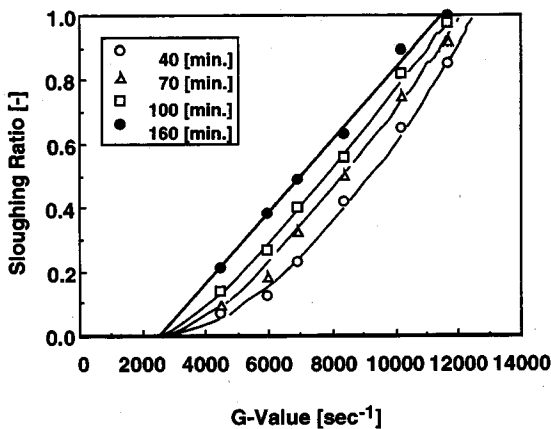


図-4 G値と生物膜の剥離率の関係

期間連続運転を行ない、膜厚が定常状態に達したものである。

剥離装置内に生物膜付着担体を静かに沈降させ、空気が入らないように密封した後、所定の回転数で搅拌翼を回転させた。ある一定時間ごとにサンプリングを行ない、SS、VSS、VSS中に含まれるタンパク質濃度を測定した。なお、これらの操作は素袋で置換したグローブボックスの中で行ない、嫌気状態を確保した。これらの一連の操作をG値を変化させて計6回行なった。

図-3は、各G値における剥離率（初期付着生物膜に対する剥離生物膜の割合）と搅拌継続時間の関係を示したものである。この図からG値が大きいかほど最終剥離量が大きいかことがわかる。特にG値が約12000s⁻¹ (2500r.p.m.)の場合には搅拌継続時間が約60分で生物膜全体のほぼ90%が剥離し、110分ではほぼ全ての生物膜が剥離してしまっていることがわかる。また、搅拌強度が大きいかほど初期剥離量が大きくなっている。図-4はG値と剥離率の関係を示したものである。図から分かるように、搅拌継続時間が長いほど剥離

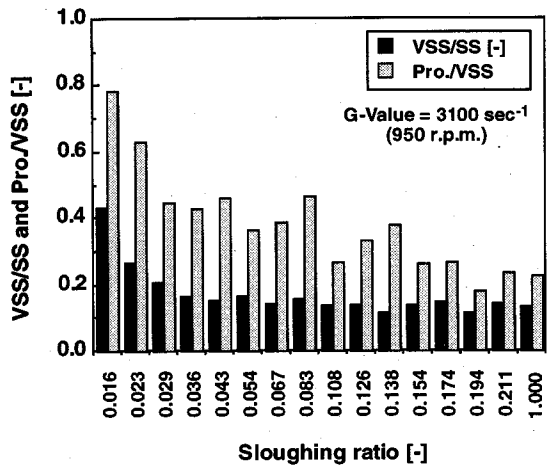


図-5 生物膜の剥離率とVSS/SSおよびPro./VSSの関係

率は高くなるが、剥離が生じはじめるG値はほぼ一致しており、その値は約2500s⁻¹である。よって図-2の回転数とトルクおよびG値の関係から、そのときに剥離装置内の液体に作用している全トルクは約0.009N・mである。このトルクを剥離装置の容積216cm³で除することにより、限界剥離強度は約40Paと推定された。これに対して、流体中で形成された生物膜は常時働くその流体による応力が剥離強度となるので、本流動床内の空塔速度を10m・hr⁻¹として、流動床内のエネルギー散逸率からその限界剥離強度は約25Paと推定された¹⁴⁾。ここで、剥離装置は矩形であるので搅拌に伴うエネルギー損失は、壁面近傍におけるものより液中におけるものの方が大きい。したがって、流動床内のエネルギー損失から求められる担体に作用するG値と剥離装置に作用するトルクより求められる限界剥離強度に相当するG値とは、オーダー的にはほぼ一致するはずである。その補正係数は25/40≒0.6となり、剥離装置内に働く応力の空間平均値の約60%が実質的に担体粒子に作用している応力と推定される。また、図-5はG値が約3100s⁻¹ (950r.p.m.)の場合における剥離率とVSS/SSおよびVSS中に含まれるタンパク質濃度(Pro./VSS)の関係を示したものである。図から固形有機物の指標としてよく用いられるVSSのSSに対する割合は、生物膜表面付近が最も高く、反対に内層になるほど低くなり、生物膜内部において無機化が進行しているものと予測された。また、菌体の指標としてよく用いられるタンパク質濃度がVSSに占める割合は、VSSのSSに対する割合と同様に生物膜表面付近が最も高く、内層になるほど低くなるが、生物膜の中層部においてその割合が高くなっている。これは、底層部においては死滅菌体や細胞外ポリマーに代表される固形有機物の分解が進み無機化が進行しているが、中層部においては固形有機物の蓄

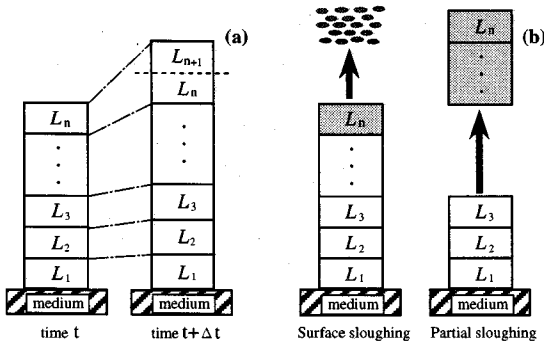
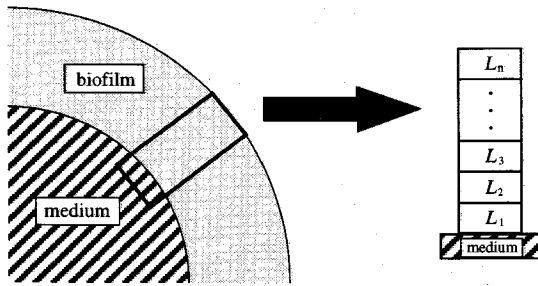


図-6 モデルにおける生物膜模式図および剥離形態

積が分解にまさっているために生じたものと考えられる。

3. 生物膜モデルの構築

非定常な水質応答および生物膜内における活性菌体、細胞外ポリマー、不活性固形有機物等の蓄積過程を表現するためには、生物膜モデルの構築が必要である。さらに、付着生物膜型廃水処理において、付着菌体の増殖・死滅に伴う生物膜の剥離機構を明らかにすることは、処理プロセスの構築、維持管理における生物膜の制御による安定した処理水質の確保、あるいは数学モデルによる水質予測等の観点から考えても重要であるので、多層型生物膜モデルを構築する。

生物膜の時間変化と空間変化に関して、一般にある有限な空間において時間平均値と空間（位相）平均値とが一致するというエルゴード性を仮定することにより、定常状態下において、生物膜の空間変化の集合はある点における生物膜の時間変化の集合に等しいとみなすことができる。よって、生物膜の時間変化をその空間変化に置き換え、生物膜モデルを構築した¹³⁾。

生物膜内部では、基質の濃度勾配が存在すると考えられるのでこの濃度勾配を表現するために、生物膜を $10\mu\text{m}$ ずつに分割し、各層での基質濃度を近似的に表現できるようにする。また、菌体量指標には活

表-1 モデルにおける菌体および基質収支式

$$\frac{\partial S_i}{\partial t} = \left(\frac{\partial}{\partial z} D \frac{\partial S_i}{\partial z} \right) - \frac{1}{Y_i} \frac{\partial X_{ai}}{\partial t} \quad \dots (1)$$

$$\frac{\partial X_{ai}}{\partial t} = \left(\mu_{mi} \cdot \frac{S_i}{K_{si} + S_i} - K_{di} - K_{hi} - K_e \right) \cdot X_{ai} \quad \dots (2)$$

$$\frac{\partial X_{hi}}{\partial t} = H(S_i) \cdot (K_{hi} \cdot X_{ai}) - (K_e + K_{di}) \cdot X_{hi} \quad \dots (3)$$

$$H(S_i) = 0 \text{ when } S_i > 5\text{mg-COD}\cdot\text{t}^{-1}$$

$$H(S_i) = 1 \text{ when } S_i \leq 5\text{mg-COD}\cdot\text{t}^{-1}$$

$$\frac{\partial X_{pi}}{\partial t} = K_{di} \cdot X_{ai} + K_{di} \cdot X_{hi} - (K_e + K_{pi}) \cdot X_{pi} \quad \dots (4)$$

$$\frac{\partial P_i}{\partial t} = \alpha_i \cdot \mu_{mi} \cdot \frac{S_i}{K_{si} + S_i} \cdot X_{ai} - (K_e + K_{pi}) \cdot P_i \quad \dots (5)$$

$i = \text{A (HAc), P (HPr), B (n-HBu), or H (H}_2\text{)}$

性菌体量^{15),16)}を用いる。この活性菌体量とは、生菌の菌体量ではなく、一定の活性を持つ菌つまり処理に有効に働く菌の存在比率を示す動力学的な手法により推定した値である。菌種によって細胞外ポリマーの生成率が異なることが予想されるが、現在のところそれに関する知見がないことから、細胞外ポリマー生成率はすべての菌の増殖量に対して一定の割合となし、総括的に扱う。また、生物膜底層部における不活性固形有機物の分解を考慮して、死滅菌体および細胞外ポリマーはその存在量に比例して分解されるとした。

本モデルに関する仮定と条件をまとめると以下に示す通りであり、基質および各菌体量の収支式を表-1に示す。ただし、この表に示した各収支式には、後述する生物学的な休眠状態菌の存在がすでに組み込まれている。

- ①分割された各層それぞれにおける基質濃度は一様である。
- ②菌体の増殖はMonod式に従う。
- ③活性菌体の全てが細胞外ポリマーを生成し、その生成量は各活性菌体の増殖量に比例する。
- ④死滅菌体および細胞外ポリマーはその存在量に比例して分解される。
- ⑤菌体量は動力学的に求められる活性菌体量とする。
- ⑥基質は酢酸(HAc)、プロピオン酸(HPr)、n-酪酸(n-HBu)、水素(H₂)の4種である。

生物膜厚の算出に必要な生物膜密度は、スタートアップ時と定常時とは異なるとの報告^{17),18)}もあるが、今回の比較の対象となる生物膜は運転が長期にわたり、定常状態に達していることから、生物膜密度は一定であると仮定した。またこの仮定によりモデルをかなり簡略化できる。

生物膜の模式図およびその剥離形態を図-6に示す。図示したように、生物膜の剥離形態は大きく2つに分けられる。1つは生物膜表面からカンナで削り取

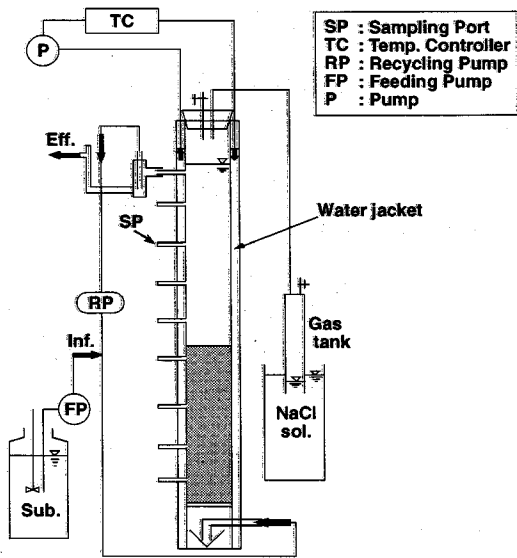


図-7 流動床の概略図

表-2 投入基質組成および装置操作条件

Reactor Volume [l]	1.80
Liquid Phase Volume* [l]	1.52
Linear Velocity [m·hr ⁻¹]	9.4~12.5
Expansion Ratio [%]	20~30
HRT [day]	1.00
Temperature [°C]	35±1
Influent VFA [mg-COD·l ⁻¹]	4000

Component [mg·l⁻¹]

HAc : HPr : n-HBu = 2 : 1 : 1**	
Influent VFA : Yeast extract = 100 : 1	
NaHCO ₃ 4250	K ₂ HPO ₄ 4250
(NH ₄) ₂ HPO ₄ 700	KCl 750
NH ₄ Cl 830	FeCl ₃ ·6H ₂ O 420
MgCl ₂ ·6H ₂ O 815	MgSO ₄ ·7H ₂ O 246
CoCl ₂ ·6H ₂ O 18	CaCl ₂ ·6H ₂ O 147

* : Including volumes of the circulating part and biofilm.
** : Based on COD concentration.

表-3 剥離装置の運転条件および剥離結果

	Operation time (min)	Cumulative time (min)	Liquid volume (ml)	Sloughed SS (mg)	Sloughed VSS (mg)	Sloughing ratio (%)	Cumulative sloughing ratio (%)
1st sloughing	1	1	170	1387.2	329.8	5.8%	5.8%
2nd sloughing	2	3	172	4028.2	636.4	11.2%	17.0%
3rd sloughing	2	5	182	3771.0	706.2	12.5%	29.5%
4th sloughing	8	13	192	8908.8	1271.0	22.4%	51.9%
5th sloughing	22	35	203	9930.8	1494.1	26.3%	78.2%
6th sloughing	55	90	210	6636.0	877.8	15.5%	93.7%

In this sloughing operation, the G-Value is 9600sec⁻¹(2200r.p.m.).

られるように一定割合で生じる表面剥離であり、他の1つは生物膜の任意の部位からランダムに生じる部分剥離である。表面剥離と部分剥離が共存する場合も考えられるが、表面剥離は部分剥離に包含されるものとする。つまり、部分剥離はランダムな部位からその剥離が生じることから、表面のごく薄い部分における剥離も生じ、いわば表面剥離と部分剥離が共存している状態とみなすことができるからである。本研究で使用した流動床では、流動床内に保持されている生物膜は定常状態に達しており、系から流出するVSSも低く保たれていたことから、流出VSSは表面剥離由来であると仮定した。各層の生物膜厚の初期値を10μm、全体の合計膜厚の初期値は実験開始時の推定値を用いて100μmと設定した。図示したように生物膜の生長により膜厚が初期値の2倍、つまり20μmに達した時にその層を分割した。

4. 生物膜内における比活性の分布特性の実験的把握

本研究では、一般に嫌気性処理において律速段階

になると考えられているメタン生成相に着目し、混合酸基質（酢酸(HAc)：プロピオン酸(HPr)：n-酪酸(n-HBu)=2：1：1)を用いて流動床を運転した。その際の流入基質濃度は4000mg-COD·l⁻¹、水理学的滞留時間は1.00dayであり、流入負荷が4.0kg-COD·m⁻³·day⁻¹となるように連続的に基質を投入した。流動床の概略図を図-7に、基質組成および運転条件を表-2に示す。また、担体には粒径が0.299~0.344mmφの人工ゼオライトを用いた。長期にわたる運転で定常状態に達した担体付着生物膜について、生物膜内における比活性の分布特性の把握を目的として、以下の実験を行なった。

(1) 担体付着生物膜の基質消費速度の測定

担体に付着した状態における生物膜全体の基質消費活性の測定することを目的として流動床本体を用いて回分実験を行なった。この実験では、反応槽に初期濃度が1000mg-COD·l⁻¹となるように単一基質(HAc, HPrまたはn-HBu)をそれぞれ投入し、揮発性脂肪酸(VFA)濃度の経時変化を測定し、この結果から各基質の消費速度を求めた。全ての回分実験

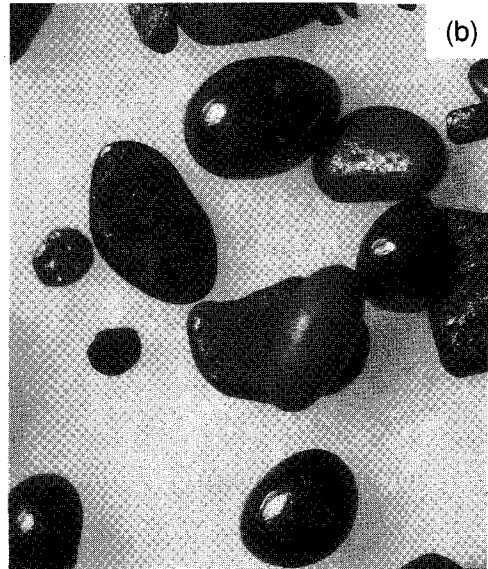


写真-1 剥離操作前後における担体付着生物膜の実体顕微鏡写真
(a)剥離操作前, (b)剥離操作後 (第3回剥離後)

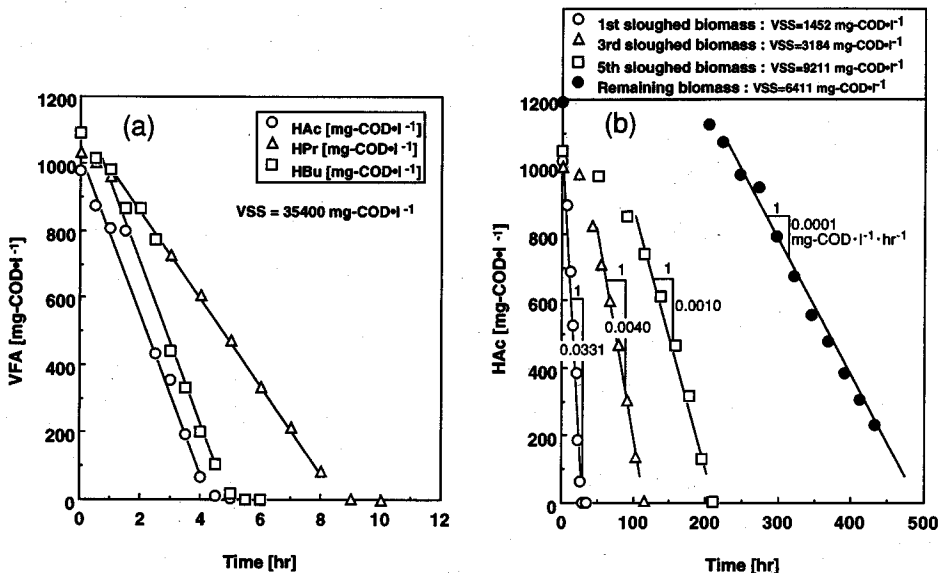


図-8 各回分実験結果による最大基質消費速度の推定(a)本体回分実験,
(b)剥離生物膜を用いたバイアル回分実験 (基質: HAC)

に用いた基質はCOD成分を除き表-2に示した組成と同一である。また同時に担体付着VSSの測定も行なった。なお、その手法は文献によった¹⁹⁾。

(2) 剥離生物膜と残留生物膜の基質消費速度の測定

生物膜の部位別基質消費活性を求めるために、段階的に剥離させた生物膜のそれぞれの基質消費活性を測定した。生物膜の剥離には、作成した剥離装置を用いた。この剥離装置を用いることにより、測定可能な剪断力を生物膜に対してほぼ一定に作用させ

ることができる。この装置を用いて段階的に剥離させた生物膜について、バイアル回分実験により基質消費活性を測定した。まず、流動床本体から担体を採取し、空気に触れないように剥離装置に移し、前述した方法で生物膜を剥離させた。この結果得られた剥離懸濁液を3つに分けてバイアルに入れ、これを検体とした。この担体について剥離操作を繰り返し、6段階に付着生物膜を剥離させ、各段階の検体を3個ずつ作成した。剥離させた懸濁液の採取および配分には注射器を用い、すべての操作を窒素ガス

表-4 推定された活性菌体量および比活性

Sample No.	Active biomass (Xa) [mg-COD·l ⁻¹]	VSS [mg-COD·l ⁻¹]	Xa/VSS [-]	Sloughing ratio [%]
HAc-1st	222	1452	0.153	5.8
HAc-2nd	100	2879	0.035	11.2
HAc-3rd	59	3184	0.019	12.5
HAc-4th	58	7576	0.008	22.4
HAc-5th	44	9211	0.005	26.3
HAc-6th	48	4734	0.010	15.5
HAc-remained	19	6411	0.003	6.3
HAc-attached	1024	35360	0.029	100.0

HPr-1st	117	1427	0.082	5.8
HPr-2nd	90	3977	0.023	11.2
HPr-3rd	67	3477	0.019	12.5
HPr-4th	63	9309	0.007	22.4
HPr-5th	49	11395	0.004	26.3
HPr-6th	27	4319	0.006	15.5
HPr-remained	8	8278	0.001	6.3
HPr-attached	755	35360	0.021	100.0

n-HBu-1st	63	1232	0.051	5.8
n-HBu-2nd	40	3623	0.011	11.2
n-HBu-3rd	31	2611	0.012	12.5
n-HBu-4th	30	9528	0.003	22.4
n-HBu-5th	21	10004	0.002	26.3
n-HBu-6th	12	5295	0.002	15.5
n-HBu-remained	13	7186	0.002	6.3
n-HBu-attached	466	35360	0.013	100.0

VSS : Values are expressed in terms of COD using 1.22 of COD/VSS ratio.
Xa : Values are estimated based on the kinetic method.

で置換したグローブボックス内で行ない、嫌気状態を維持した。剥離装置の運転条件および剥離結果を表-3に示す。この結果から、最終的には生物膜全体の9割以上が剥離していることが分かる。また、生物膜は内部にいくほど強固になるので、剥離はほぼ表面から生じたものと考えられる。剥離操作前後における担体附着生物膜の実体顕微鏡写真を写真-1 (a), (b)に示す。これらの写真は電子顕微鏡写真ではないことから確実な判断はできないが、剥離操作後(第3回剥離後)も生物膜表面に顕著な凹凸が見られないので、生物膜の表面からはほぼ順序よく層状に剥離できたと考えられる。これらのサンプルを恒温振とう培養器にかけ、ほぼ完全に分散状態にした後、回分実験を行なった。また、剥離操作後の担体附着残留生物膜についても同様にバイアルを用いて回分実験を行なった。なお、バイアルを用いた回分実験手法は、久場らの方法⁹⁾に準じた。

(3) 活性菌体量の推定

流動床本体とバイアルを用いた回分実験の結果の一例を図-8 (a), (b)に示す。ただし、剥離生物膜を用いた回分実験結果については、HAcを基質とした場合のみを示している(図-8 (b))。基質消費曲線の接線部の傾きから消費速度を求め、最大比増殖速度をそれぞれHAc : 0.26day⁻¹, HPr : 0.19day⁻¹, n-HBu :

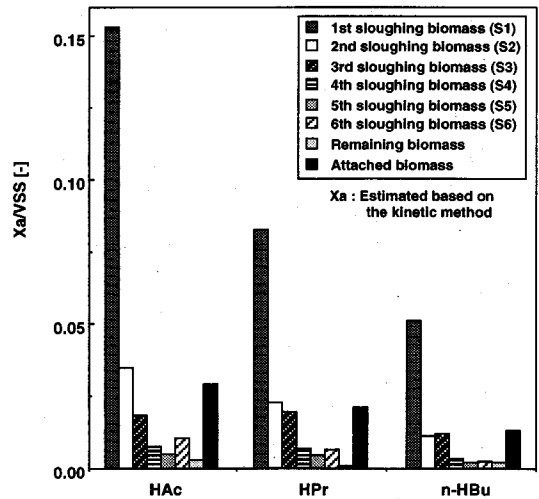


図-9 剥離、附着および残留生物膜の比活性の比較

0.60day⁻¹¹⁵⁾、増殖収率をすべて0.05mg-COD_{cell}·mg-COD⁻¹²⁰⁾として、初期活性菌体量Xaに換算した²¹⁾。しかし、このXaでは比活性を単純に比較できないため、ここでは菌体量(VSS)あたりの値(Xa/VSS)を比活性の指標として用いることにした。得られたXa, VSS, Xa/VSSの値を表-4に示す。なお、生物膜中には金属化合物等、灰分となり得るものがかかり存在する⁹⁾ので、これらの影響を除くために菌体量としてVSSを用いている。流動床の液相における基質濃度が低い場合には生物膜内で基質供給律速の影響が存在すると考えられるが、附着状態の生物膜、剥離させた生物膜および残留生物膜の活性測定のための回分実験では、いずれも投入基質濃度が十分に高く、基質供給律速は無視できると考えられる。よって、これらの実験結果の比較から空間的な競合の有無の比較ができるので、生物学的な休眠状態菌の存在の有無を確認できると考えられる。比活性を比較すると、図-9に示すように、いずれの基質消費活性も剥離の進行に伴って低下しており、生物膜の底層部ほど活性が低下していることがわかる。これは剥離が頻繁に起こっている生物膜表層に活性菌が多く存在していることを示している。活性菌体量は最大比増殖速度に直接関連しており、最大比増殖速度によって変化する。しかしながら、活性菌体量は生菌の菌体量ではなく、一定の増殖速度(あるいは活性)を持った菌量の推定値であり、また推定に用いた最大比増殖速度も本流動床を用いて実験的に求められた値⁹⁾である。よって、異なる基質分解菌において一定の活性を持った菌の存在比率を比較できると考えられる。各基質分解菌について比較すると、Xa/VSSの大きさはHAc, HPr, n-HBu分解菌の順に小さ

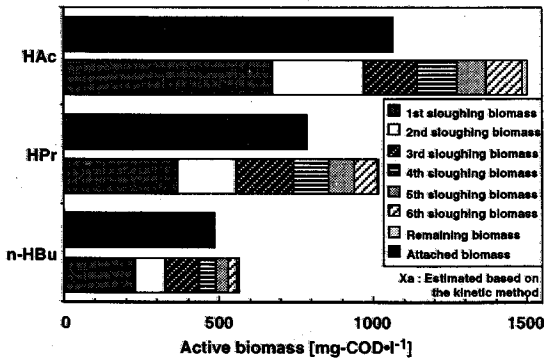


図-10 活性菌の総量の比較
(付着生物膜と剥離部分+残留生物膜)

くなっていることがわかる。HAc利用菌は剥離が生じやすい表層付近で特に多く存在している。HAcの投入濃度がHPr、n-HBuの2倍であり、HPr、n-HBuの分解からもHAcが生成されるため、HAc利用菌に利用される基質の量は多くなる。したがって、菌体量も多くなり基質との接触が容易な表層部に特に多く分布するようになると思われる。また、どの基質消費菌についても活性菌の存在割合は担体に付着した状態での生物膜よりも剥離させた生物膜の方が大きくなっていることがわかる。この結果は、生物膜内部における菌相互の競合等が原因となり一時的に活動を休止している生物学的な休眠状態菌が存在する可能性を示している。また表-4からわかるように全ての活性菌の合計量は生物膜全体の1割にも満たない²⁰⁾。今回は水素利用菌の活性菌体量を測定していないが、その量を考慮したとしても生物膜内において死滅菌体および細胞外ポリマーに代表される不活性固形有機物の占める割合は9割近くに達すると推定される。

(4) 生物膜内における利用基質別分解菌の分布特性

流動床内の担体付着VSS、担体付着生物膜の沈降体積および担体の質量から求められる担体表面積を用いて、生物膜の平均膜厚は約120 μm と推定された。ただし、担体(ゼオライト)の形状を球と仮定し、沈降時の生物膜付着担体の空隙率を0.4としている。またそれぞれ剥離させた生物膜厚の推定値は表層から順に約5, 9, 11, 22, 33, 26 μm であった。剥離させた生物膜および残留生物膜内の活性菌体量の総和と担体付着生物膜内の活性菌体量を比較したものが図-10である。この図から、どの基質消費菌についても剥離された生物膜および残留生物膜内の活性菌体量の総和は担体付着生物膜内の活性菌体量よりも多いことがわかる。この結果は、前述したように活性菌、死滅菌および細胞外ポリマーの他に、生物膜内

部において菌相互の競合等が原因となり一時的に活動を休止している生物学的な休眠状態菌が存在している可能性を示唆している。剥離生物膜および残留生物膜内の活性菌体量の総和と担体付着生物膜内の活性菌体量を比較すると、HAc利用菌が約1.4倍、HPr、n-HBu分解菌がそれぞれ約1.3, 1.2倍となっており、担体付着生物膜内の活性菌の2~3割にあたる量の休眠状態菌が生物膜内に存在していると考えられる。すなわち、このことから休眠状態に由来する活性の低下分は、活性菌体量の2~3割に相当すると推測された。

(5) 生物膜モデルへの休眠状態菌の導入

モデル化において、休眠状態菌は活性菌の周囲の基質濃度がある値以下になると活性菌の存在量に対して一定比率で活性菌から転換され、ある濃度以上になると元に復すると仮定する。なお、本シミュレーションにおいては、この基質濃度が飽和定数に対して十分に小さいと考えられる5mg-COD $\cdot\text{l}^{-1}$ ¹³⁾と設定する。休眠状態菌は一般に周囲の環境条件の悪化に対する耐性が活性菌に比べて高く、新陳代謝の速度も遅くなり^{22),23)}、その代謝活性の低下から死滅速度もかなり低下することが予測される。よって、休眠状態菌の死滅係数(K_d)は活性菌の半分であると仮定する²⁴⁾。また休眠状態菌体の蓄積はおもに休眠係数とその死滅係数とによって規定されるので、休眠係数はその死滅係数を考慮して0.02day $^{-1}$ と仮定する。休眠状態菌を導入した各収支式は表-1に示した通りである。

5. 生物膜モデルによる各菌体量の膜内分布の推定

計算時の定常値、初期値として流動床の有効容積、流量、各基質の流入濃度には実験値を、動力学定数には本流動床を用いて推定した値⁹⁾を用いた。計算に用いた各パラメータを表-5に示す。各菌体量の初期値は、各層いずれの層においても等しいと仮定した。シミュレーションにおける定常膜厚は前述の推定値を用いて120 μm と設定した。

図-11に計算結果である生物膜内の比活性の膜厚方向分布を示す。この図の左端が担体表面であり、右端が生物膜表層である。比較のために併記した剥離部位別および残留生物膜の比活性の実測値は、剥離させたそれぞれの膜厚における比活性の平均値である。このシミュレーション結果は、生物膜が定常状態に達したと考えられる約5000時間経過後のものである。この図から活性菌体および休眠状態の菌体の比活性は生物膜表層から生物膜の厚さ約90 μm のとこ

表-5 シミュレーションに用いた各動力学定数

Substrate	S_0 [mg-COD \cdot l $^{-1}$]	HRT [day]	μ_m [day $^{-1}$]	K_s [mg-COD \cdot l $^{-1}$]	Y [-]	K_d [day $^{-1}$]	α [-]	K_{fl} [day $^{-1}$]	K_{fPo} [day $^{-1}$]	K_h^* [day $^{-1}$]	D [m 2 \cdot sec $^{-1}$]
HAc	2000		0.26	20							
HPr	1000	1.00	0.19	20	0.05	0.04	0.175	0.001	0.001	0.02	1.0×10^{-9}
n-HBu	1000		0.60	90							
Hydrogen	0		1.2	0.0016							

*: The value of 0.02 day $^{-1}$ was used only when the substrate concentration was below 5mg-COD \cdot l $^{-1}$

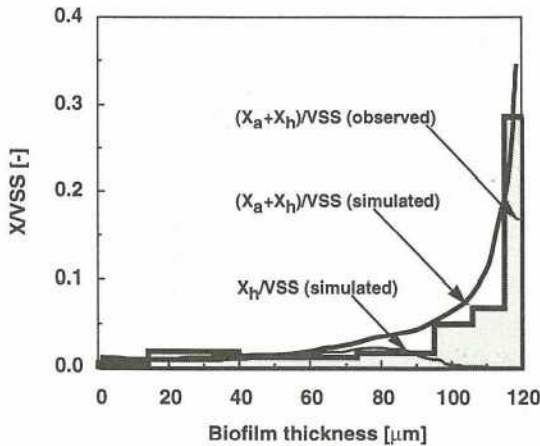


図-11 生物膜内における活性菌および休眠状態菌の分布に関する計算結果と実験値の比較

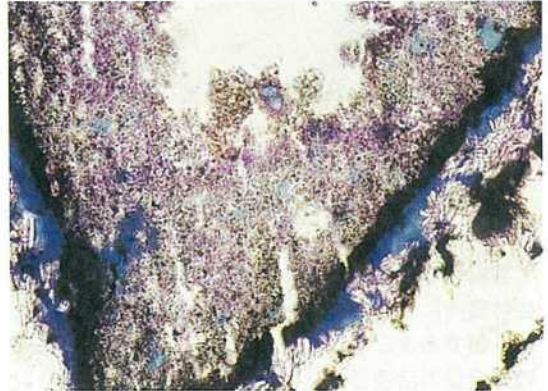


写真-2 トルイジンブルーにより菌の染色を施した生物膜の断層顕微鏡写真

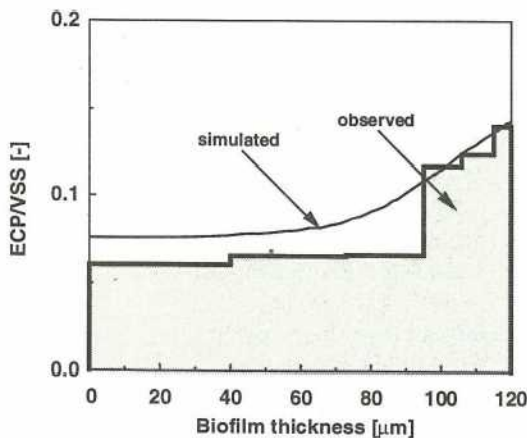


図-12 生物膜内における細胞外ポリマー (ECP)の分布に関する計算結果と実験値の比較

ろまで急激に減少し、そこから生物膜底層部にかけて緩やかに減少していることがわかる。ここで、生物膜表面から20 μ mまでを表層部、20 μ mから70 μ mまでを中層部、70 μ mから担体表面までを底層部とする。生物膜の断層写真(写真-2)からも活性菌および休眠状態菌(トルイジンブルーにより青く染色されている部分)は表層部に多く存在しており、中・底

層部における存在量が少なくなっていることがわかる。ここで、トルイジンブルーとは塩基性タール色素の一つで一般に細胞の核染色に用いられ、生細胞(ここでは活性菌および休眠状態菌)と不活性固形有機物を染め分けることが出来るものである。計算結果と実測値と比較すると、全体として計算値と実測値はほぼ一致しており、実測値をよく表現できていることがわかる。また、図-11から生物膜中層部から底層部にかけては活性菌体量よりも休眠菌体量が上回っていることから、膜内の中・底層部における活性菌体の休眠状態化が進行していると推察される。図-12は細胞外ポリマー(ECP)の膜方向分布の計算結果と実測値を比較したものである。この図から計算値は生物膜の中・底層部において若干高い値を示しているものの、全体としてはほぼ一致していることがわかる。以上の計算結果から、このモデルにより生物膜内における活性菌、休眠状態菌、および細胞外ポリマーの膜厚方向分布を表現できることが明らかとなった。

図-13に計算結果である活性菌、休眠状態菌、死滅菌、細胞外ポリマーの構成比の膜厚方向濃度分布を示した。この図から、休眠状態菌は生物膜表層部付近にはほとんど存在せず、生物膜中・底層部におい

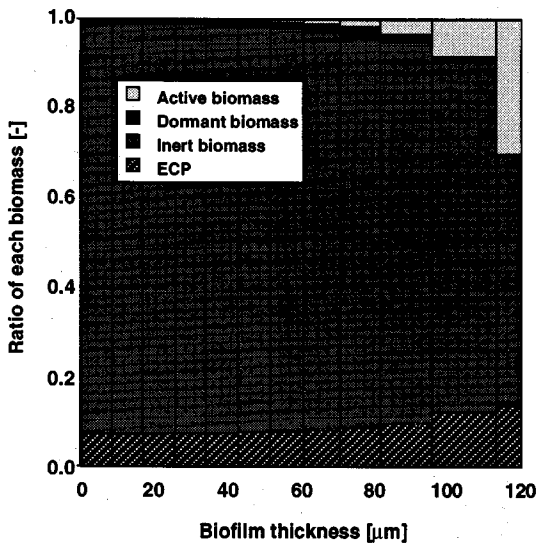


図-13 各菌体の膜厚方向濃度分布の計算による予測

て蓄積する傾向がみられることがわかる。またその生物膜内における全存在量は活性菌体の全存在量の約3割であることから、実験結果である休眠状態菌の推定量の活性菌体量に対する割合(2~3割)とおおよそ一致する。よって休眠係数として仮定した 0.02day^{-1} はほぼ妥当であるといえる。

以上の計算結果と実測値の比較から、本生物膜モデルによって活性菌体および休眠状態の菌体の比活性の生物膜内分布がほぼ表現でき、本生物膜モデルの妥当性が示された。

本モデルを用いることによって生物膜内における各菌体量分布の推定を行なうことが可能であることから、様々な剥離条件下における生物膜内の各菌体量分布等を予測することができる。例えば、あるショックロードにより、大規模の生物膜剥離が生じた場合の生物膜の回復に要する時間およびその際の生物膜内における各菌体量分布の推移等を予測できる可能性がある。

6. 結論

本研究では、生物膜の特性および生物膜内における各菌体群の分布特性を表現することを目的として、多層型生物膜モデルを構築した。また、生物膜内の各菌体の分布特性を把握するために、メタン生成流動床内の担体付着生物膜をその表層から段階的に剥離させ、その基質消費活性を測定した。この実験結果から活性菌、死滅菌に加えて新たに膜内における"休眠状態菌"の存在について検討を行なった。さらにこの休眠状態菌を上記の生物膜モデルに導入す

ることにより、より正確な菌体分布の予測が可能なモデルへと改良し、実験結果と比較することによりその妥当性を検討した。本研究を総括すると以下のようである。

- 1) 本流動床における生物膜の限界剥離強度は約25Paであることが実験的に推定された。
- 2) メタン生成流動床内の担体付着生物膜を段階的に剥離させてその基質消費活性を測定し、その実験結果から膜内における"休眠状態菌"の存在に関する検討をした結果、休眠状態菌が生物膜内に存在することが実験的に示された。
- 3) 休眠状態に由来する活性の低下分は、活性菌体量の2~3割に相当すると推測された。
- 4) 休眠状態菌の存在を新たに導入した生物膜モデルを構築し、実験結果と比較することによりその妥当性を検討した結果、本モデルにより活性菌、休眠状態菌、細胞外ポリマーおよび死滅菌の膜厚方向分布をほぼ表現でき、本モデルの妥当性が示された。
- 5) 本モデルにより、様々な剥離条件下における生物膜内の各菌体量分布、基質濃度分布等を予測できる可能性がある。

記号

- D : 拡散係数[$\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$]
 K_d : 死滅係数[day^{-1}]
 K_d' : 休眠状態菌の死滅係数[day^{-1}]
 K_e : 剥離係数[day^{-1}]
 K_f : 不活性固形有機物の分解係数[day^{-1}]
 K_b : 休眠係数[day^{-1}]
 K_s : 飽和定数[$\text{mg} \cdot \text{COD} \cdot \text{l}^{-1}$]
P : 細胞外ポリマー濃度[$\text{mg} \cdot \text{COD}_{\text{poly}} \cdot \text{l}^{-1}$]
S : 基質濃度[$\text{mg} \cdot \text{COD} \cdot \text{l}^{-1}$]
t : 時間[day]
 X_a : 活性菌体濃度[$\text{mg} \cdot \text{COD} \cdot \text{l}^{-1}$]
 X_b : 休眠状態菌の菌体濃度[$\text{mg} \cdot \text{COD} \cdot \text{l}^{-1}$]
 X_d : 死滅菌体濃度[$\text{mg} \cdot \text{COD} \cdot \text{l}^{-1}$]
Y : 増殖収率[$\text{mg} \cdot \text{COD}_{\text{cell}} \cdot \text{mg} \cdot \text{COD}^{-1}$]
z : 膜厚方向の厚さ[μm]
 α : 細胞外ポリマー生成率[$\text{mg} \cdot \text{COD}_{\text{poly}} \cdot \text{mg} \cdot \text{COD}_{\text{cell}}^{-1}$]
 μ_m : 最大比増殖速度[day^{-1}]
上付き添字: α (流入)
下付き添字: A(HAc), P(HPr), B(n-HBu), H(H₂), I(死滅), Po(細胞外ポリマー)

参考文献

- 1) 井上雄三, 神山桂一: 改良型二槽嫌気性消化法による下水処理に関する基礎的研究, 下水道協会誌, Vol.22, No.255, pp.33-43, 1985.
- 2) 依田元之, 服部美和子, 宮地有正, 松井三郎: 嫌気性流動床による下水処理(2)一有機物除去の速度論的解析, 下水道協会誌, Vol.23, No.269, pp.37-43, 1986.

- 3) 榊原豊, 湯沢恩, 黒田正和: メタン菌固着生物膜槽における酢酸除去速度の解析, 土木学会論文集, No.375/II-6, pp.311-318, 1986.
- 4) 古米弘明, 松本明人, 松本順一郎: 嫌気性膨張床におけるメタン生成に及ぼす流入負荷の影響, 下水道協会誌, Vol.24, No.280, pp.25-34, 1987.
- 5) 稲森悠平, 松重一夫, 岡田光正, 砂原広志, 須藤隆一: 嫌気性ろ床法の負荷変動下における浄化特性に関する研究, 下水道協会誌, Vol.25, No.293, pp.69-80, 1988.
- 6) 原田秀樹, 桃井清至, 石浜英司, 種市尚仁: 嫌気性細菌の自己造粒機構を利用したメタン発酵リアクターの高速処理特性, 衛生工学研究論文集, Vol.24, pp.241-251, 1988.
- 7) 松本明人, 野池達也: 嫌気性流動床におけるメタン生成に及ぼす流入基質濃度および流入負荷の影響, 水質汚濁研究, Vol.13, No.1, pp.54-62, 1990.
- 8) Arvin, E. and Harremoes, P.: Concepts and models for biofilm reactor performance, *Wat. Sci. Tech.*, Vol.22(1/2), pp.171-192, 1990.
- 9) Furumai, H., Kuba, T., Imai, T. and Kusuda, T.: Transient Response of Wastewater Treatment and Biomass Development in a Methanogenic Fluidised Bed, *Wat. Sci. Tech.*, Vol.23, Kyoto, pp.1327-1336, 1991.
- 10) 古米弘明, 今井 剛, 楠田哲也: 嫌気性流動床における付着生物膜内不活性有機固形物の蓄積過程のモデル化, 水環境学会誌, Vol.15, No.11, pp.828-838, 1992.
- 11) 古米弘明, 今井 剛, 楠田哲也: メタン生成流動床の処理特性と付着生物膜の成長過程の非定常解析, 水環境学会誌, Vol.15, No.11, pp.839-849, 1992.
- 12) 今井 剛, 楠田哲也: 嫌気性流動床における生物膜内の基質消費活性分布について, 第31回環境工学研究フォーラム講演集, B-2, pp.52-54, 1994.
- 13) 今井 剛, 楠田哲也, 古米弘明: 嫌気性流動床における生物膜のモデル化に関する研究, 環境工学研究論文集, Vol.30, pp.209-217, 1993.
- 14) 荒木宏之, 古賀憲一, 井前勝人, 楠田哲也: 機械曝気を受ける活性汚泥の沈降特性に関する基礎的研究, 下水道協会誌, Vol.28, No.324, pp.1-9, 1991.
- 15) 久場隆広, 古米弘明, 楠田哲也: バイアル実験によるメタン生成活性の測定手法に関する検討, 水質汚濁研究, Vol.13, No.2, pp.121-125, 1990.
- 16) 古米弘明, 久場隆広, 楠田哲也: 嫌気性混合培養系における酢酸利用メタン生成菌の活性菌体量推定法とその応用, 衛生工学研究論文集, Vol.26, pp.9-18, 1990.
- 17) 荒木信夫, 原田秀樹, 桃井清至: 嫌気性流動床内生物膜の形成過程における微生物集積効果, 衛生工学研究論文集, Vol.28, pp.1-9, 1992.
- 18) 荒木信夫, 原田秀樹, 桃井清至: 嫌気性流動床内の生物膜の物理性状に及ぼす上昇線流速の影響, 水環境学会誌, Vol.16, No.3, pp.209-218, 1993.
- 19) 今井 剛, 古米弘明, 楠田哲也: 嫌気性流動床における剥離速度と付着生物活性に関する研究, 衛生工学研究論文集, Vol.28, pp.11-20, 1992.
- 20) Lawrence, A., W. and P. L. McCarty: Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment, *Journal of WPCF*, Vol.41, R1-R7, 1969.
- 21) 今井 剛, 古米弘明, 楠田哲也: メタン生成相における嫌気性菌の死滅係数推定に関する検討, 水環境学会誌, Vol.15, No.3, pp.179-186, 1992.
- 22) 服部 勉: 微生物生態入門, 東京大学出版会, 1978.
- 23) 長谷川武治編著: 微生物の分類と同定, 学会出版センター, 1975.
- 24) 今井 剛, 河村幸雄, 楠田哲也: 嫌気性流動床における生物膜の動力学的解析, 土木学会西部支部研究発表会講演概要集, II-110, pp.348-349, 1993.

(1995. 4. 12 受付)

KINETIC STUDY AND MATHEMATICAL MODELING OF BIOFILM IN A METHANOGENIC FLUIDIZED BED

Tsuayoshi IMAI and Tetsuya KUSUDA

The objectives of this study are to develop a layered biofilm model which expresses distributions of active biomass, dormant biomass, and extracellular polymer in biofilm with attrition in a methanogenic fluidized bed reactor, to discuss availability of the model in comparison with experimental results, to evaluate possibility of the existence of "dormant" biomass in the biofilm, and to estimate distributions of the active biomass, dormant biomass, and extracellular polymer in biofilm by the model. Comparing specific activities of sloughed and remaining biomasses with those of attached biomass, the existence of "dormant" biomass in the biofilm was indicated. The model is available to express distributions of specific activities of active and dormant biomasses in the biofilm with high accuracy.