

BOD試験に関する研究(第二報) —反応速度論的考察—

東大工 正員 市川新 ○横山道子

1. はじめに 本報告は第26回土木学会学術講演会(1971年)において 同題の下に発表した実験結果を、反応速度論的に考察を加えたものである。そこで示したように、1つの希釈倍率につき50～60本のふらん瓶に廃水を分注し、20°C恒温室で同一条件下に静置してBOD反応が、再現性が高くかつ異なる希釈倍率との比較も充分に行なうると結論出来るに至り、この解析を行つたものである。我々の対象とした廃水は、下水処理水・湖沼等の自然水であり、それらは、それらの生活空間において、充分に馴致されており、選択的基質分解の行なわれる可能性のある複合基質のBOD試験にこれから述べる現象が直接適用出来るものではないことを付記しておく。

2. BOD試験における細菌の活性 BOD試験は、酵素の存在下における細菌の有機物分解過程を考えることが出来る。原生動物がBOD試験に影響を及ぼすとの説もあるが、今回使用した廃水においては、原生動物による呼吸量は、ほとんど無視出来るものと考えている。表1に示したもののは希釈直後0.45μmのミリポアフィルターで汎過を行つた場合の濁度物質濃度である。原生動物はその大きさからみてこの汎紙上に捕獲されるものと考えるが、その量は僅か1～2mg/lのオーダーであり、さらにこの値から濁度残差をさしひいて考えると、より小さな値となることとなる。それ故 濁度酸素の減少はすべて、細菌の呼吸作用によるものと仮定しても大きな誤りはないものと考え、以下にその解析を進める。

細菌の濃度を示す指標がいろいろ提案されていいるが、ここでは上水試験法に定められた一般細菌数測定法を使用した。有機栄養菌の測定の為の培地や、標準培地に、基質を添加して細菌数を検討する研究が多く見られるが、ここでオーネドックスなものに限つて行つたのは特な理由はないが、試験に耐えていたことと、簡便であることにによるものである。事実一般細菌数のうち、ビロバクが生物酸化に関与するか定かではないが、解析を対数増殖期に限つて行ない、この期間における基質の分解に対する増殖して13の2次式を用いて実数は示せないとしても、この解析に用いても大きな誤りはないと考えている。

Table-1 Suspended Solids
determined by Millipore filter (0.45μ)

Series	Sample	Dilution	S.S. (mg/l)	VSS/TSS (%)
III	S.E.	3	2.00	38.5
		6	1.05	81.0
IV	S.E.	4	0.60	
		8	0.36	
VII	P.	3	1.25	
		6	0.50	
VIII	P.	no	2.70	91.5
		2	1.27	92.1
		3	1.05	95.2
IX	P.	2	2.57	33.9
		3	1.83	83.6
		4	2.17	77.0

[VSS/TSSは東洋汎紙GB100(ガラス纖維)で汎過したものと105°C及び600°Cで加熱させて、その比をとしたものである。]

当対数期の初期に時間
間、細胞細菌数をと

る(その1例を第2
6回土木学会概要集
に示してある)と、

1~2日間は、ほぼ
直線であることが認
められ、いわゆる対
数増殖が行なわれて
いることがわかる。

対数増殖の継続時間
と、対数増殖速度を
表2に示す。Series
IV(下水処理水)の
場合は、細菌数はほ
ぼ一定値を示し、僅
かづつ上昇している

にすぎず対数増殖という事は出来ない。この時の溶解酸素の減少が5日間で0.8 mg/lと極端に小さか
ったことからも、対数増殖と基質の分解が行なわれなかつたといつても差支えないと思われる。

対数増殖速度の多くのものは、1.0(1/日)のオーダーである。希釈倍率の差(すなわち基質濃度の差
)による速度の差については、あきらかな傾向が認められず、この実験からだけでは定性的なことを
言うことは出来ない。なお活性汚泥の生化学的考察を行つた実験結果は、1ス~1.6(1/日)となつて
おりそれを比較すると1桁小さな値となつている。

次に細菌の呼吸量を求めてみる。対象とする範囲が対数増殖期の場合は、(1)式によつて求め、細菌
数が減少している時及び(1)式のチャックの為に(2)式を用ひた。その結果は表3に示す。

Table-3 Respiratory Activity ($10^{-7} \text{ O}_2 \text{ mg/number/day}$)

Series	Sample	0-1 day			1-2 day			2-3 day		
		low	high	+Dex.	low	high	+Dex.	low	high	+Dex.
II	S.E.	0.08	0.14		0.21	0.09		0.10	0.02	
IV	S.E.	0.49	0.30	0.08	0.13	0.03	0.12	0.36	0.10	0.02
VII	P.	2.27	1.20	5.1	3.40	2.84	3.1	5.87	3.47	2.0
VIII	P.	260	26.2	48	55.0	2.7	1.95	26	2.0	0.38
IX	P.	25.2	34.3	3.95	3.05	2.68	0.82	2.62	1.94	0.11
XII	A.R.	9.8		2.1	1.27		4.0	0.7	0.6	

手録：都立大学構内池(2.42), 碑文池(1.58), 諏訪湖(4.44) 単位 $\times 10^7 \text{ mg/個/日}$
low・high はそれやれ低希釈倍率・高希釈倍率を示し、多くの場合4の比は2倍となる。といふ。

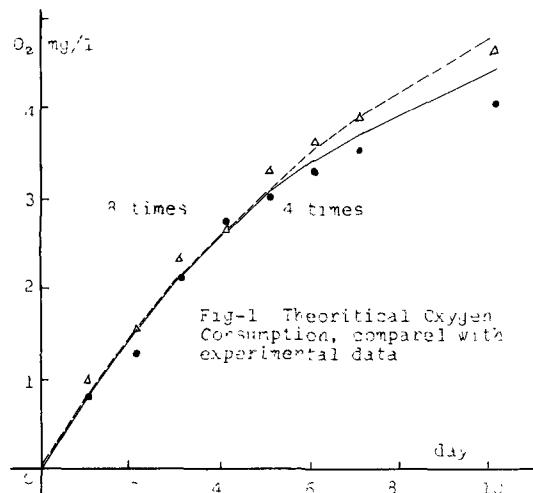
$$Q_1 = \frac{2.303 \cdot \Delta R \cdot \log \frac{B_t}{B_{t-1}}}{(B_t - B_{t-1}) \cdot t} \quad \dots \dots (1) \quad Q_2 = \frac{2}{B_t + B_{t-1}} \cdot \Delta R \quad \dots \dots (2)$$

なおこの式を用いて池及び湖沼で実測された手塚のデータを合わせて示した。この計算にありて、毎日のデータに変動があったので、移動平均をとり、それをもとにして計算を行なつたのであるが、³⁾0日目すなわち希釈直後の細菌数の測定がどうしても希釈分注作業の時間だけ遅れ誤差が出易く、出来事だけ早く行うようにし、さらに、0.25日、0.5日と測定して、この誤差を小さくするよう努めながら充分でなく、そのため呼吸量の計算値もかなり変動している。表3をみてわかるように、日数が経過するに伴い呼吸量が減少していることがわかる。これは、酸素消費量が指数関数的に減少していくことと、細菌数が指数的に増加していくことから当然のことである。前に述べたことから1/16日目の呼吸量が基準になるものと考えられるが、それによると、 $10^{-7} \sim 10^{-8} \text{ O}_2 \text{ mg/個数/日}$ のオーダーであり、処理水の $8 \times 10^{-9} \text{ O}_2 \text{ mg/個数/日}$ の値は、手塚のデータと、ほぼ同一であるが、多くの場合は、 $4 \sim 8 \times 10^{-8} \text{ O}_2 \text{ mg/個数/日}$ とやや高めの値となっている。次に希釈倍率の差をみると、基質濃度が減少するにつれて、呼吸量が減少している。これは、希釈倍率が小さくなると酸素減少量は少なくなるが細菌数はそれ程大きな変化を示さないことが大きな原因であると考えられる。特に、下水処理水の場合その差が大きく、基質濃度が2倍になると、呼吸量は3~4倍になつている。

3. 反応論—Michaelis model の適用の検討。 一般にBODは、一次反応といわれているので、ここでもモーメント法により、反応恒数をと、対数BOD:Lとを求め、その理論曲線上実測値とをプロットしてみると、図1に示すように、きわめてよい結果が得られ、一見、一次反応のように見られる。表4に反応恒数を、Lを示す。希釈率の異なる2つの一次反応式を比べてみると、希釈率が増加する（基質濃度が低くなる）とL値は小さくなり、逆にL値は大きくなつてあり、

Edeline⁵⁾が実際の河川の多くの実験結果からLとL値は逆比例の関係にあることを示したのと、ほぼ

Table-4 Kinetics of BOD
determined by moment method



Series	Sample	Dilution	k_1^{\ddagger} (l/day)	L (mg/l)
IV	S.E.	4	0.081	9.852
		8	0.054	15.240
V	S.E.	6	0.135	71.562
		4	0.068	44.240
VI	River	8	0.053	53.920
		3	0.174	30.570
VII	River	6	0.120	38.508
		2	0.073	22.694
VIII	P.	2	0.140	14.016
		3	0.085	14.604
		4	0.072	13.728
X	P.	3	0.153	5.220
XI	A.R.	no	0.108	1.721

同じ結果となつてゐる。Series IX(不思池)に示すように、希釈倍率が異なることにより K_m 値は0.072~0.14と大きな差が認められますが、この3つの曲線はほぼ同一の曲線となつてゐる。これは一次反応式が適用されるというより、一次反応式は數学的にかなり広い通用性があり、多くの実験結果を、指數関数に示せるということにすぎず、ここでも、実験結果に適合するくたゞ、Lの組み合わせは無数にあるものと考えられ、それ故、単に直線に近似出来るからといって、それから反応恒数を論ずることはあまり意味がないと考えられる。前節において、対数増殖期の増殖速度が求められたので、これと基質濃度とを対応させることにより、BOD試験がMichaelis modelに適合する酵素反応であるかどうかを検討してみる。この場合、一番重要なことは、基質濃度を何であらわすかということである。同一濁水中における、希釈倍率の異なるものについては、基質濃度が希釀倍率の比になつてゐることには確かであるが、濁水毎の比較を行なう場合は充分検討を加えなければならぬ。活性汚泥の実験では、基質濃度としてCODを用いることがある(例えばGaudy⁴⁾)ので、ここでもはじめに希釀直後のCOD値を基質濃度としてとり、基質(S)と基質(S)/増殖速度(u)をそれぞれ横軸、縦軸にとつてみると、図2-a.に示すようになる。図2-a.を見るとわかるように、きわめて変動が大きく、実際には、これらの点を結ぶ直線は無数にあり、この図から結論を導き出すことは不可能であるが、分布する点の集合の包絡線を図に示したように、直線I、IIとひくことにより、その勾配及び切片の値を求めた。一方下水処理水を原水とした場合には変動がやうに大きく、上の二点から直線をひいたのがIIIである。これから U_m と K_m を求めてみるヒ表のようになる。 K_m 値は、5.75~15.11の範囲にあることにより我々の希釀濁水のCOD値にかなり近い値となつてゐる。 U_m は0.75~2.22の値となり、下水の場合きわめて高い値となつてゐる。多くの実験の対数増殖速度は、ほとんどの範囲内にあり、最大速度にかなり近い反応が起きているのではないかと推定される。しかし、Series IV(処理水)は、この値から大きくなつてゐることになり、Michaelis modelの適用外であることがわかる。しかし、COD値というのは、有機物の総量であって、生物分解可能な有機物を示すものとは限らないので、ここでとりあげる基質とすることはきわめて疑問である。

そこで、スクの方法によりCOD値から生物分解する有機物指標を推定しようと試みた。第一の方法は、5日間BODヒ5日間COD

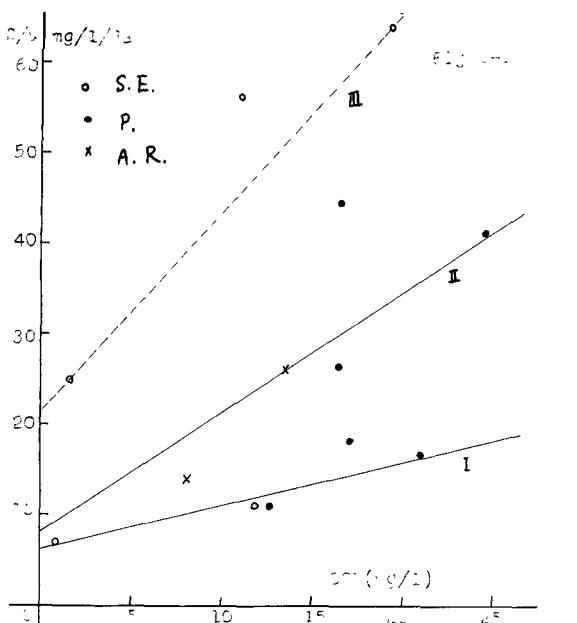


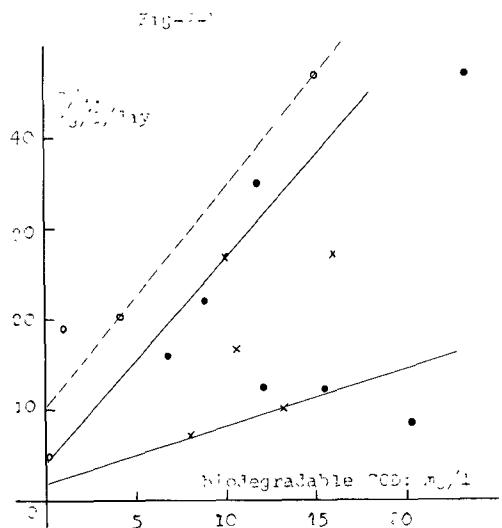
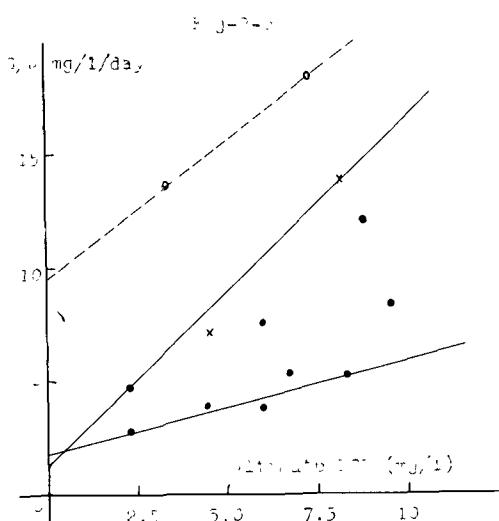
Table - 5 Range of K_m and U_m

		U_m (1/day)	K_m (mg/l)
COD	Sewage Effluent	0.465	10.14
	Natural Water	0.75-2.22	5.75-15.11
BOD	Sewage Effluent	0.694	6.80
	Natural Water	0.59-2.00	1.07-3.80

の減少量の比を生物分解比とし、これをCOD値にかけあわせたものを基質濃度とした。オズの方
法は、同じ希釈倍率のものに、グルコースを4.5
mg/l 添加して、グルコースによる酸素消費量を
求め、これヒグルコースが完全に分解するのに必
要な溶解酸素量(4.8 mg/l)との比を生物分解比
(生化学ではこれを呼吸商といつとし、同じく
COD値にかけあわせたそれを指標とする方法で
ある。図2-1はこの2つの方法による基質濃度
を計算し($S - S/\mu$)平面にプロットしたもので
あるが、図2-2に比し変動が小さくなっている。
前と同じように包絡線を推定して描き、各々の K_m
 K_m を計算した。これによると、 K_m 値は1.79
~4.52 mg/lとなり平均の酸化率を65%とする

と、COD値にはすると、スケル6~6.95 mg/lに相当し、さわめて低い値となる。この最大速度も実
際にはいくつかはこれに近いか、それ以上のものもある。

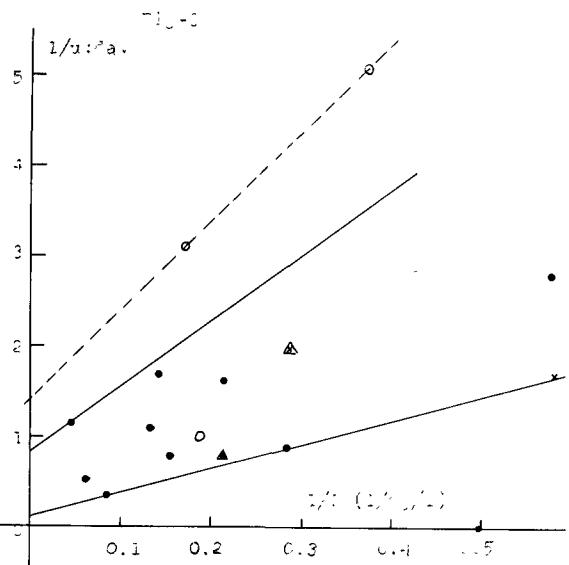
次に、基質濃度としてBODのplateau値(平衡値)を基質濃度としたすが、BOD反応の原理から
みて妥当ではないかと考え整理してみた。この場合、モーメント法で求めたL値をplateauとして用
いた。実験において、硝化反応が認められたのは Series II のみであり、不忍池、小河内ダムの場合
計算とする2~5日間には硝化反応は認められなかつた。Series II(下水処理水)の場合には、反応
がおもくモーメント法によるところか 0.05(%)以下となり L 値が求められなかつたので、同一希釈倍
率に硝化作用抑制剤ATUを加えた場合の平衡値代用して、この解析のL値として使用した。又、
異なる希釈倍率のL値の差が大きかつた Series IV(処理水)は対数増殖速度が小さく、モデルの適



記号	
Q_1	細菌一個当たり呼吸量 (mg/個数/day)
ΔR	単位時間当たり酸素消費量 (mg/l)
Bt	細菌数 (個数/ml)
k_1	一次反応恒数 (1/day)
L	窮極BOD (mg/l)
K_m	ミカエリス定数 (mg/l)
S	基質濃度 (mg/l)
u	反応速度 (1/day)
u_m	最大反応速度 (1/day)
S.E.	下水処理水
P.	池
A.R.	人工貯水池

用範囲外と思われたので除外し、その他は *Bacillus* IX (不思池) にみられるように、 L 値がほぼ一定であり、さらに、図から平衡値を求めてもし値とそれ程大きな差はない等の理由により L 値を使用してもそれ程大きな問題はないと考えた。グルコースを加えた場合についても、計算を行ったが、この場合は添加しない場合の L 値に添加グルコースが完全に分解するに要する酸素必要量の理論値を加えたものと、先に述べた呼吸商を考えて、実際に分解に要した酸素量を加えたものの 2 種のデータを示して、図 2-C における、△をつけたのが呼吸商を考えた計算値である。これをみると、下水とそれ以外の液体との間に大きな差が認められるが、ほぼ同じような範囲にあり COD 値で整理したものに比べて変動が小さい。図 2-a と同じように包絡線で整理すると対数増殖速度は 0.59 ～ 2.00 で、表 2 に示した速度とよい対応を示している。 K_m 値は下水処理水の場合 6.80 mg/l となっており、自然水の場合 $1.07 \sim 3.80 \text{ mg/l}$ となり、 L 値に比べると若干小さめの値となっている。このような方法で求めた K_m 値が真的ものであるかどうかはこれだけの実験では明らかではないが、 K_m 値は標準希釈法の基質濃度とオーダー的には同じであると考えてもそれほど大きな誤りであるとは考えられない。この実験での基質濃度が K_m 値に近いことから、このデータ ($\frac{1}{L} - \frac{1}{S}$) 平面上にプロットしてみる。図 3 は基質濃度を S 値にとったものである。このプロットから同じように点の包絡線の Lm 値 $0.13 \sim 1.0$ (1/日)、 K_m 値は $8.4 \sim 37.5$ ($S - S_m$) 平面の場合よりも変動が大きくなっている。

4. 実際の K_m 値の算定 前節で BOD 反応が酵素反応であるが、さらに Michaelis model を適用出来るかの検討を行い、包絡線という概念を用いることにより、BOD 反応が Michaelis の仮説に従うとある程度予想することが出来た。そこで実際の BOD 試験の K_m 値を求めるには、希釈倍率を求める上に重要な意味をもつと考えるので以下に求めることにする。一般に行なわれているような Lineweaver-Burk の方法を BOD 試験にあてはめるには、基質濃度を多くがえねばならない。活性汚泥の K_m 値を求めた Gaudy の実験では、基質濃度を 10 種類とて行つていて、BOD の場合飽和溶解酸素濃度が $8 \sim 9 \text{ mg/l}$ であり基質濃度にあらずから制限があり、僅か 2 ～ 3 種の基質濃度でしか実験を行ひえない。このようにして行つて 2 ～ 3 の基質濃度でえられた点から直線をひくことは可能であつても誤差が大きくその信頼性は低く、結論を出すことは危険であろう。ここで Stratten et al.⁶⁾ が開拓した 2 つの反応曲線から求める方法に改良を加えて、データを整理してみることにする。すなわち、基礎方程式として Monod (1942) の model をとり $ds/dt = -KX \cdot S/K_m + S$ 今、 S を基質濃度とすると、 $K \cdot X$ は細菌による単位時間当りの基質利用量に等しい。この解析では、 S を COD ないし m という酸素消費量でとつていてこから、 $K \cdot X$ は細菌の酸素消費量と考えてそれ程大きな誤りはない。この K 値は表 3 に示した値をとり、 X に細菌数をとってみる。2 つの反応線について、この式を変形



$$\text{レズ. } -K_X = \frac{K_m + S_1}{S_1} \cdot \frac{dS_1}{dt} \quad -K'_X' = \frac{K_m + S_2}{S_2} \cdot \frac{dS_2}{dt}$$

とおき、累次希釈倍率の曲線から $K_X = K'_X'$ になるような2点 t_1, t_2 を求め、それから

$$\frac{K_m + S_1(t_1)}{S_1(t_1)} \cdot \frac{dS_1}{dt} \Big|_{t=t_1} = \frac{K_m + S_2(t_2)}{S_2(t_2)} \cdot \frac{dS_2}{dt} \Big|_{t=t_2} \text{ とおき, } K_m \text{ について解く}$$

$$K_m = \frac{\frac{dS_2}{dt} \Big|_{t=t_2} - \frac{dS_1}{dt} \Big|_{t=t_1}}{\frac{dS_1}{dt} \Big|_{t=t_1} - \frac{dS_2}{dt} \Big|_{t=t_2}} \text{ となり, } K_m \text{ 値をグラフ上から計算する事が可能であつ。}$$

今、反応曲線を指數関数 $y = L e^{-k_L t}$ として近似出来るとするなら、上の K_m 値は

$$K_m = \frac{k_1 S_1(t_1) - k_2 S_2(t_2)}{k_1 - k_2} \text{ で示される。}$$

本来 K_m 値は、時間 t_1 (t_1 が決定されれば t_2 は自動的に決定される) に無関係であり、対数増殖期ならどの点をとってもよいと考える。実際の計算において、低希釈倍率の反応曲線を S_1 で示し、 $t_1 = 1/\beta$ とし、その時の呼吸量を求め、高希釈倍率の細菌増殖曲線からそれに等しくなるような時間 t_2 を求め K_m を求めた。この場合、基質濃度としては、前節の考察を通じて L 値をとった。その結果は表 6 に示す。なお Series VII (神田川では細菌数が減少していきるので、計算上は求められたが、Model の考え方からすると適用出来ないものと考える。この場合の L 値を参考値に示した。この値はいずれも、前節の $S-S/\mu$ 平面で求めた範囲よりも大きいか ($\frac{1}{L} - \frac{1}{S}$) 平面の値に近くなっている。

この計算には、多くの仮説が用いられていり、理論的には時間 t に無関係に K_m が一定でなければならぬが、対数増殖期間の長さ、溶解酸素消費曲線の形等により、必ずしも K_m が一定とならなかつた。このことから、 K_m 値そのものについて議論することは、今のところ無理と思われるが、自然水を BOD 標準希釈法で行う場合、 K_m 値はオーダー的には L 値ないし飽和溶解酸素量の値に近いという事が出来るものと考える。

5. 考察

以上、 K_m 値について述べてきたので、ここで、その意味を考察し、BOD 試験にあたり注意せねばならない点を考えみたい。濃度と反応速度を模式的にえがくと図のようになる。さらに式化し $\mu = aS [0 \leq S \leq S_0]$

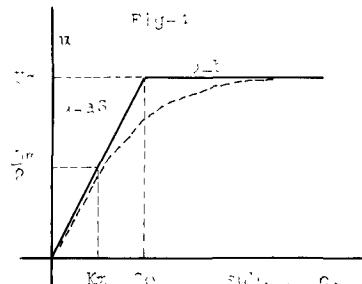
$$= \mu_{max} [S > S_0]$$

とおけるとする。当然、 K_m 値は $\frac{S_0}{2}$ となる。すなわち、基質

濃度が $2K_m$ 値迄は濃度の増加にともない、反応速度は増加するが、それ以上になると、濃度に関係なく一定となる。この model のように、表現出来るなら基質濃度が S_0 までは一次反応、それ以上の時は 0 次反応といふことが出来る。勿論、実際の反応系は、このようでは model 化が行なえず、最大速度には K_m 値の 3~4 倍であることが多い。前節並に行なった計算からみると、 K_m 値が約 $5 \text{ mg/L}/10 \text{ mg/L}$ のオーダーであるので、基質濃度が $20 \sim 50 \text{ mg/L}$ の場合には、一次反応ないしそれに近い反応

Table 6 Estimation of K_m

Series	$K_m (\text{mg/l})$	$L (\text{mg/l})$
II	18.11	5.89
IV	4.37	2.46
IX	8.07	7.06
VII	10.07	10.19



と言えるが、それ以上の場合には、0次反応に近いものと推定される。標準希釈法の場合と日間BOD値で3~7mg/lの範囲になるように基質濃度を定めているので、L値にすると最大15mg/l程度であり、それ以上の場合は、溶存酸素が完全に消費されてしまい、測定が行えない。それのみならず、基質濃度が高いと0次反応となることがあるもあり、一次反応論的データの整理のみでは説明がつかない現象が起きてくることを予測せらるものである。しかし、 K_m 値の近くの基質濃度は直ちに一次反応であると決めつけるのも早計すぎそれをみると、基質濃度を(0~ S_0)変化させた時の反応速度を正確にあげなければならず、なんらかの形で追跡したいと考えている。なお、現在多く提案されているようなWarburg法をはじめとする、呼吸速度法、及び曝気法では、その基質濃度を標準希釈法の数倍高くして行なうのが普通であるので、0次反応の範囲で呼吸量を測定している場合が多くなっているのではないかと考えられる。標準希釈法と本質的に異なる反応である可能性を示唆するものであり、単に結果値(積分値)の比較を行ったり、それから求められた一次係数を用いて計算されるBOD₅との比較をする際には、このような反応速度論的考察を抜きにすることはないわめて危険であると考える。検水をヨーロッペの運河(Canal Albert)として酸素飽和度を用いて溶存酸素の直線消費曲線を描き、時間を4時間あてにヒリHartmannの四角形上にプロットしたものを作成して示す。理論的には、この平面上 横軸に平行な曲線を描く時が、0次反応で、縦軸に平行な時が一次反応となるが、この場合4日後から一次反応を示す直線となつてなるが、それ以前は別の反応と考えられる。実際の濃度反応速度の曲線は図-4に示したような直線でなく、点線で示したようなものと考えられるので、横軸に平行でなく45°に近い直線になつてなるものと考えられる。この直線でみる限り、希釈時にありては基質濃度が高くなる反応に近い反応であり、基質が分解するにつれて一次反応の領域となつて反応が行なわれてなると考えることが出来ここに述べたように仮説が成り立つことを示唆している。

6. おわりに 本研究は未だ緒につりばかりで、実験を行う上での分析技術及び時間等、様々な制約があるので、これだけで結論づけは出来ず、今後検討していくつもりである。

- Bibliography:
- 1) 市川・横山 [第26回土木学会学術講演会概要集II] 605 1971
 - 2) 市川・横山 [下水道協会誌] Vol.8, No.88, 8 1971
 - 3) Tezuka: Jap. Jour. Ecology Vol.18, No.2, 60 1968
 - 4) Gaudy et al: Applied Microbiology Vol. 21, No.2, 253 1971
 - 5) Edeline: Canal Albert: CEBEDEAU (1967)
 - 6) Stratton et al: Canadian Journal of Microbiology Vol.15, 1201 1969
 - 7) Hartmann: Advances of Water Pollution Research Vol. 4, I-14, 1969

