

活性汚泥微生物の連続培養系における非定常特性について

北海道大学工学部 正会員 寺嶋 重雄
 学生員 ○加藤 善盛

1. はじめに

活性汚泥法に限らず多くの生物学的な廃水処理の制御に関して、発酵工業等工業微生物分野におけるのと異って、流入源の負、量を人為的に制御することが原則的に不可能であるという点でオ一の困難性が伴っている。オ二の制御に関する困難性は、多種類の微生物群により構成されているため、生物自身による生態学的な意味での制御機構が働いている点にあり。以上の二つの基本的な困難性の故に、実処理プラントではきわめて非定常的な条件下に運転せざるをえない。オ二の問題に関しては、それをオ一の Input の変動の結果と見做すことが妥当であろうから、生物学的処理プロセスの合理的設計とともに運転(制御)は、基本的に Input の非定常性に対する微生物の増殖、代謝などの応答特性を明らかにすることに依拠している。この場合、定常、非定常を問わず微生物の反応を如何なる動力学によって記述するかが問題となる。種々の環境条件下において、それに対応して種々の生理学的な制御が行われ、その結果増殖、基質の摂取、細胞形態、細胞表面の特徴的な物性等が制御されている。環境条件と増殖の関係については、主として細胞外基質濃度と増殖速度の関係を動力学に導入した Monod 理論により一般に取り扱われてきたが、微生物の生理学的内容を記述するものではないため、特に非定常条件下でその適用することには限界があることが容易に推察されよう。著者らは先にバッチ実験の結果から、基質除去活性あるいは代謝活性が、微生物の生理的条件のちがい(より具体的には、細胞主要成分の構成比のちがい)に左右され細胞内の炭水化物と核酸成分またはタンパク質の動向が重要であることを述べた^{1,2)}。本報告の目的は、活性汚泥プロセスの動的解析の基礎として Recycle のない連続培養条件下における非定常特性について実験的検討を行い新たなモデル提示のための基礎的知見について述べることにある。

2. 一般的考察

Recycle の伴わない完全混合連続培養システムでの微生物濃度と増殖制限基質濃度の変化は、次式で表わされる微生物濃度に関して

$$dx/dt = \mu x - D x \quad (1)$$

基質濃度に関して

$$ds/dt = D(S_i - S) - \mu x/Y \quad (2)$$

ここに x ; 微生物濃度(mg/l) S_i ; 流入基質濃度(mg/l) S ; 流出基質濃度(mg/l)

μ ; 比増殖速度(h^{-1}) Y ; 転換率

D ; 希釈率($=Q/L = 1/t_d$; Q ; 流量, V ; 反応槽容積, t_d ; 停留時間)(h^{-1})

Herbert らは μ に Monod モデルを適用し連続培養系の理論的、実験的解析を行った。³⁾ Monod の提示した基質濃度と μ の関係式は

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (3)$$

ここで μ_{max} ; 最大比増殖速度(h^{-1}) K_s ; 飽和定数($\mu = \frac{1}{2} \mu_{max}$ の時の基質濃度 S)(mg/l)

(3)を(1)および(2)に代入すると

$$dx/dt = \left\{ \mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) - D \right\} x \quad (4)$$

$$ds/dt = D(S_i - S) - \frac{\mu_{max}}{Y} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) x \quad (5)$$

定常状態においては $dx/dt = 0$, $ds/dt = 0$ において式(1)より

$$\mu = D \quad (6)$$

ところで自己消化速度を考慮するとすれば、真の増殖速度を μ_t , 自己消化速度を μ_d で表わすと μ は見かけ

上の比増殖速度であるから

$$\mu = \mu_t - \mu_d \quad (7)$$

又式(2)より

$$Y_t = (S_i - S) / X_t \quad (\text{添字 } t \text{ は定常値を示す}) \quad (8)$$

式(4)から

$$S = k_s \left(\frac{D}{\mu_{\max} - D} \right) \quad (9)$$

式(5)から

$$X_t = Y(S_{in} - S) = Y \left\{ S_{in} - k_s \left(\frac{D}{\mu_{\max} - D} \right) \right\} \quad (10)$$

パラメータ $\mu_{\max}$, Y , k_s が既知である場合には、式(4), (5)の数値解を得ることにより、遷移状態の微生物濃度、および基質濃度の応答の予測が可能である。これらのパラメータは、バッチ実験あるいは連続流の実験結果(式(7), (8))から決定される。

3. 実験方法

槽容積 5L の連続培養装置を用い、散気球④により約 5L/min の空気をエアレーションを行い混合液はオーバーフローさせ⑤連続的に Drain を行った。槽内は長期間グルコース基質で 24 時間サイクルの fill and draw 方式で培養した活性汚泥の沈澱上澄水をもって行い、増殖が活発になった後、各停留時間で連続培養を開始した。基質は微量ポンプにより連続注入⑥した。装置の概略を図-1 に示す。非定常実験は少なくとも二日間以上定常値を保った後に行った。基質の組成は表-1 に示す通りである。微生物濃度は OD_{660nm} により測定し、メンブレンフィルター法で求めた換算値から固形物濃度に換算した。流出水中の基質濃度は、0.45M のメンブレンフィルター液中の糖濃度をフェノール硫酸法⁽⁴⁾により定量しグルコース当量で表わした。また一部 TOC も測定した。細胞の炭水化物含量は、混合液の炭水化物濃度を Total とし、3 液中の炭水化物の濃度差から求めた。培養槽内 DO は EIL 社の DOメータにより連続記録を行った。実験期間中、槽壁に生物が付着するのを防ぐため頻りに混合液で洗った。温度は槽中央のヒータにより 20±0.8℃ に保った。

表-1 基質組成 (pH 7.4)

グルコース		1.00 gr
増化アモニウム	NH ₄ Cl	0.35 gr
硫酸マグネシウム	MgSO ₄	0.07 gr
リン酸カリウム	K ₂ HPO ₄	0.18 gr
リン酸ナトリウム	Na ₂ HPO ₄ ・2H ₂ O	0.95 gr
水道水		1 L 中

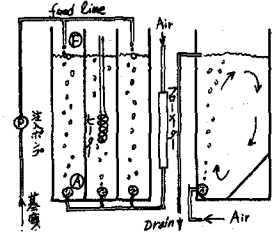


図-1 装置概略図

4. 実験結果とその検討

4-A 定常状態について

定常状態の結果を表-2 に示す。Monod 式の定数 k_s および Y は式(7), (8)から各希釈率について求めた。 Y および細胞炭水化物含有率 (G) を図-2 に、 k_s および基質残存率 ($E_r = S_i / S_{in}$) を図-3 に示した。これらの図から式(4), (5)においてシステム定数とされる Y および k_s は両者とも定数とみなすことができない。転換率 Y に関する同様の傾向は特に純粋培養の実験結果にみられるが、同じグルコース基質を用い混合微生物系について行った Gaudy らの報告 (Y はほぼ一定) と結果を異にする。また Gaudy らは Monod モデルが混合微生物系においてよく適用できるとし、 k_s としてバッチ実験から、炭水化物 COD で 181 mg/L、連続培養実験では約 90 mg/L という値が得られたとしている⁽⁷⁾。とこそ定常状態では、 $\mu = D$ であるから連続流データから k_s を求めるには $D = \frac{1}{2} \mu_{\max}$ の時の基質濃度をみればよい。Gaudy らの連続流のデータからこのようにして k_s を求めると炭水化物 COD で 8 mg/L となっており矛盾している。

次に Y が変化することについてであるが、希釈率の減少に伴い転換率が低下する原因として次の三つの現象が考

表-2 定常値

実験 NO	D (hr ⁻¹)	S _{in} (mg)	S _{out} (mg)	ST (mg)	ZT (mg)	G (%)	Y _t (%)	E _r (%)	F _s	K _s
A-1	0.049	1000	2000	7.8	44.6	27.8	45.0	0.79	0.110	66.2
A-2	0.067	970	2000	7.4	47.1	18.1	48.1	0.76	0.140	44.0
A-3	0.095	1000	2000	12.8	53.6	21.3	54.3	1.29	0.177	49.7
A-4	0.133	1040	2000	8.9	56.1	21.9	56.6	0.96	0.238	22.3
B-1	0.168	468	750	3.2	27.9	21.8	55.9	0.68	0.281	5.7
B-2	0.168	468	998	3.5	27.8	20.1	57.4	0.73	0.281	6.2
B-3	0.168	450	1250	4.0	27.9	19.5	62.6	0.87	0.271	7.1
B-4	0.168	500	1500	3.0	29.1	21.2	58.6	0.60	0.289	5.3
C-1	0.252	500	1000	12.1	33.7	16.3	69.1	2.32	0.374	10.2
C-2	0.252	1000	2000	7.6	62.1	17.9	63.4	0.80	0.402	6.4
D-1	0.444	500	1000	18.9	31.3	15.3	57.8	3.78	0.798	1.0

S_{in}: 初期定常状態の流入濃度
S_{out}: 非定常実験における Step 変化流入濃度

G: 細胞炭水化物含有率
E_r: 基質残存率

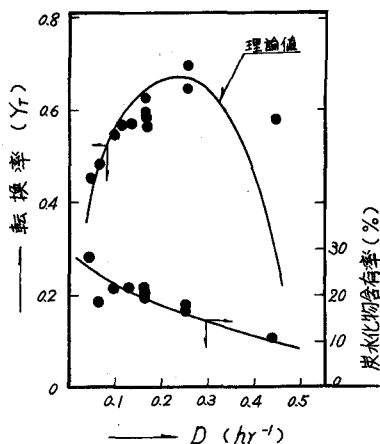


図-2

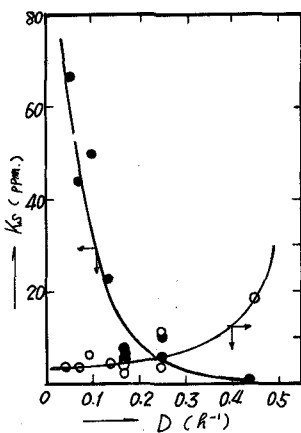


図-3

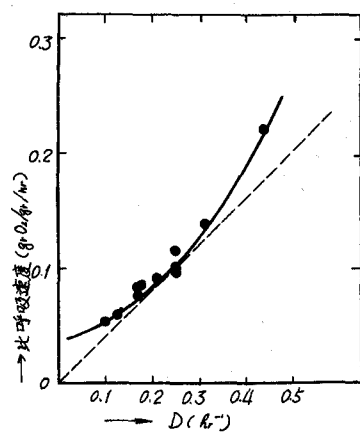


図-4

えられている。すなわち、(a)平均滞留時間が増加するにつれ inhibitor の濃度が増加することによる⁸⁾。(b)細胞の老化により流出速度に相対的にみあうだけ増殖がバランスできない⁹⁾。(c)維持エネルギーの相対的増加¹⁰⁾の三つである。本実験の結果を(b)に関連すると考えられる通常の自己消化速度 ($M_d = 0.003 \text{ hr}^{-1}$) で補正 (すなわち $\mu = \mu_x / (S_m - S)$) の $\mu_e = \mu + M_d$ であるから M_d のかわりに μ_e を用いて計算しても無相小であった。(c)との関連で増殖率と比呼吸速度をみると、図-4に示したように、 $D < 0.2 \text{ hr}^{-1}$ において相対的に比呼吸速度の高い傾向がみられる。また図-2に示した細胞炭水化物含有率は、 D が小さくなるにしたがって高くなっており、老化細胞が多くなり全体として細胞壁成分の比が大きくなっていくものと推察される。

式(4)、(5)に関してパラメータが一定でよいとすると、非定常下で振動現象を生じシステムの不安定性を増大するこれが考えられ¹¹⁾パラメータ特性は重要である。以上の結果から混合微生物系である活性汚泥の如く、流入源の非定常性から、生物の生理状態の制御に重点をおかねばならぬ場合において、それを考慮したモデルが必要であり Monod モデルは混合微生物系の定常状態においてもそのまゝ通用できない。

4-B 非定常時の増殖速度、転換率の挙動とその関連性

非定常時の μ の挙動に関して在来二つの考え方が提示されている。まず、増殖が一連の酵素反応の結果とし、特に基質濃度が増加または減少したときに酵素反応のある動的な平衡状態から次の新しい平衡状態に遷移するまでに時間的遅れがある場合、図-6に示すようなヒステリシス曲線の関係があるとする考え方である¹²⁾。

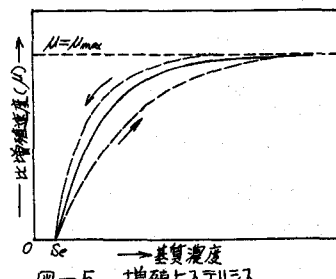


図-5 増殖ヒステリシス

混合微生物系での非定常下の遅延応答をこのモデルで説明しようとする試みはなされているが定量的表示の段階までにはたっていない¹³⁾。他の一つは温度、流入濃度の Step 上昇に対し増殖速度が急増する現象があることから有効反応ポテンシャルの概念の導入である¹⁴⁾。すなわち微生物はある環境下で RNA したがって蛋白質の合成活性が最大レベルにあるのではなく Step 変化が生じた場合、その最大活性レベルまでほとんど瞬間的に上昇可能とするものである¹⁵⁾。また Schaezler は、混合細胞系と糸状菌をつかったバッチ実験と連続培養実験の結果から、負荷率に相当する次式で示されるような基質フラックスが基質濃度より制御因子となりうることを示唆している⁹⁾。基質フラックスを F_s で表わせば、

$$F_s = D \cdot S_m / X$$

(11)

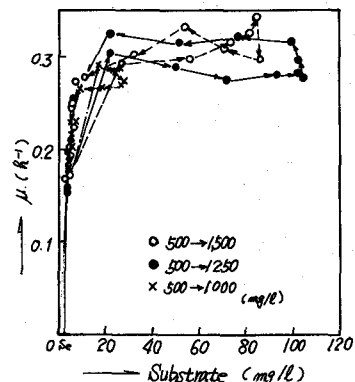


図-6 比増殖速度の転換

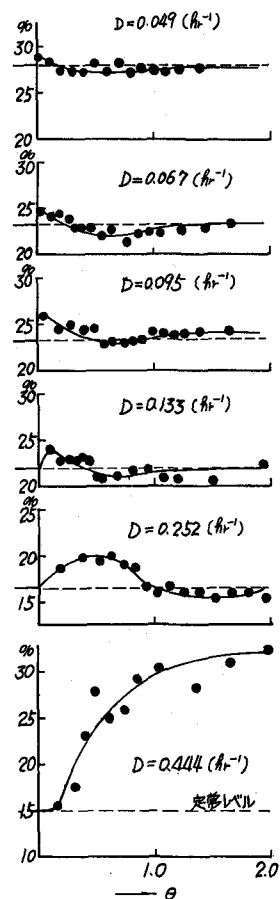
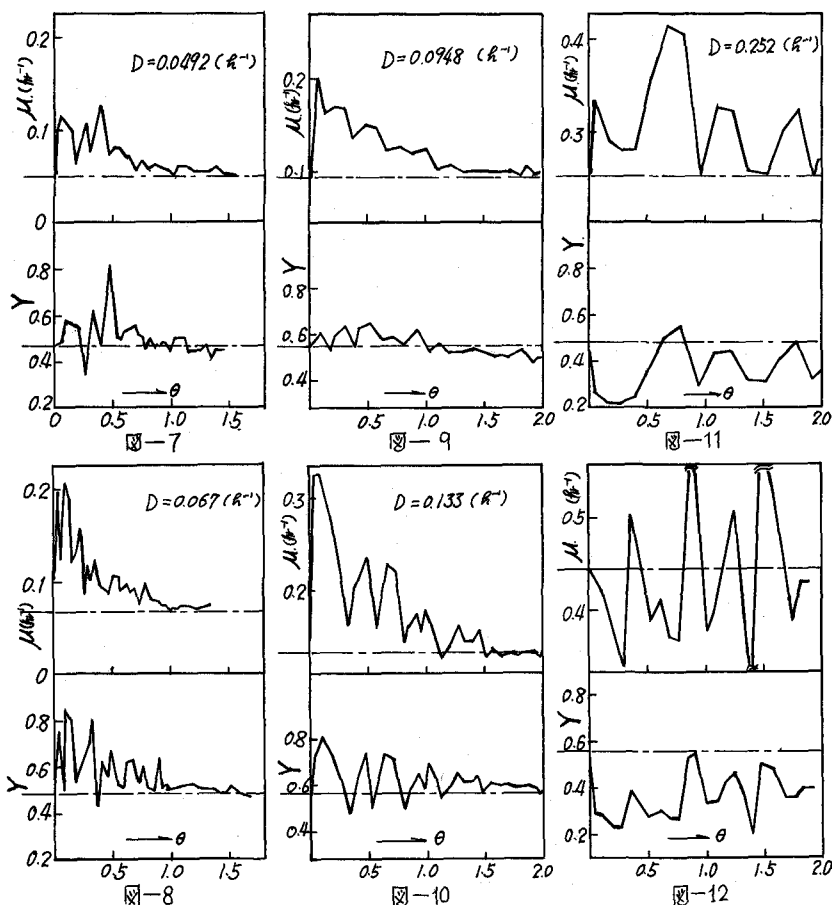


図-7～図-12 ; 流入基質濃度が2倍のStep変化した場合の比増殖速度(μ)および収率の過渡応答
 図-13 ; 細胞炭化率の過渡応答
 $\theta = t/t_a$ (t_a : 平均滞留時間) 無次元時間 (定常レベル ———)

本実験のため、非定常時に比較的流出水中の基質濃度の変化が大きかった実験番号B-2, 3, 4の結果から、比増殖速度と 残存基質濃度との関係を求めたのが図-6である。この結果から実験規模の範囲内(図-5)に示すような明瞭なステラリス現象はみられなかった。また比増殖速度が律速を受ける基質濃度のレベルは低く、比較のために便宜的に K_s 値と示すと約 6 ppm 程度であった。流出水の基質濃度の変化は次頁図-14に示す。

次に非定常時における比増殖速度と転換率の変化であるが、流入基質濃度の Step 変化を初めの定常値の2倍に変化させた実験A, C, Dの結果を図-7～図-12に示す。(尚 μ および Y の計算はサンプリング時間間隔の範囲内で $dX/dt \approx \Delta X/\Delta t$ 及び $dS/dt \approx \Delta S/\Delta t$ の式(1), (2)が用いられた。) この結果をみると、比増殖速度は流出水の基質濃度が定常値のレベルをほぼ維持できる希釈率の範囲内 ($D \leq 0.133 \text{ h}^{-1}$) では、Step 変化と同時に急増し、その後指数的に減衰していき最初の定常レベルに漸近した。またこの場合の転換率の変化は、比増殖速度の動向と同様の挙動を示した。流入基質濃度の変化に対する比増殖速度の二通りの挙動は、その時の平均滞留時間あるいは希釈率に密接に関連する⁽¹⁶⁾という興味ある結果が得られているが、基質濃度が定常レベルを維持できず上昇する希釈率の条件では、比増殖速度の増加は急激ではなく、その間転換率は逆に一時的に低下しその後定常値に回復する傾向がみられた。

本報では生理的な変化の指標として細胞内炭化率含有率の動向しか追えなかったが、図-13に示した様に特徴的な変化を示した。すなわち流出水の基質濃度の変化がほとんどは希釈率の範囲内において、Step 変化と

同時に若干の急増があり、その後わずかにあるが定常レベル以下に一時的に低下し定常値へと漸近した。しかしながら流出水基質濃度の変化の大きい実験C-1 ($D=0.252 \text{ h}^{-1}$)の結果では、非定常の初期に炭水化物の蓄積が著しく、図-14に示したように流出水の基質が増加し続けた実験D-1 ($D=0.444 \text{ h}^{-1}$)の場合には、炭水化物の蓄積が進行し続け回復はみられなかった。

以上の結果を総合すると、比増殖速度はあるレベルまで急増可能なこと、そのレベル以下では、比増殖速度と転換率は正の相関を示し、それ以上のレベルでは負の相関となることが判明した。このうち後者の関係は図-2に示した定常値の動向と同じ傾向になっている。実験B系列で行った希釈率を一定とし流入濃度の変化量を4段階にとった時の結果では、変化量が小さいと、基質濃度は定常レベルを維持するが大きい場合には、図-13の $D=0.252 \text{ h}^{-1}$ と同様のパターンを示した。したがって図-6に示したように律速基質濃度レベルの小さいことと考へ合せると、比増殖速度、転換率の変化の原因は、濃度が律速因子ではなく前記したように基質フラックスが律速因子となることが推察される。そこでこの基質フラックスと、定常時の基質濃度に対する非定常時のピーク値の比率との関係を全実験について求めてみた。これを図-15に示す。図から明らかなように流出水の基質濃度が実際に変動を示さない最大基質フラックスが存在し、このフラックス以上では、ピーク値が基質フラックスに比例して増加した。このことは基質フラックスの増加に対して微生物の増殖の方に制限があることを示し、したがって比増殖速度と基質フラックスの関係を動力学モデルとして設定する必要があるのではないかと。非定常時における実験結果からその関係を求めたものが図-16である。この関係は見方を変えると各基質フラックスに対応した可能な増殖能を示し、増殖Capacityを表わしているとも考えることができる。Monodの修正式に準拠して増殖Capacityを次式で定義することにある。

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{F_s^2}{K_F + F_s^2} \right) \quad (12)$$

ここで F_s : 基質フラックス (h^{-1}) K_F : 定数 (h^{-2})
本混合微生物系では $\mu_{\max} = 0.465 \text{ h}^{-1}$, $K_F = 0.119 \text{ h}^{-2}$ であった。

ところで定常状態における転換率は式(1), (2)から

$$Y_T = X / (S_i - S) \quad (13)$$

$S \ll S_i$ の場合には実際上 $Y_T = X / S_i$ で表わせるから

$$\mu = Y_T / F_s \quad (14)$$

式(14)の右辺分母分子に D を乗すると $Y_T = D \cdot X / S_i \cdot D$ 、定常では $\mu = D$ であるから
 $Y_T = \mu (X / D S_i)$ 式(13)を代入すれば $Y_T = \mu / F_s$

したがって増殖Capacityを表わす式(12)から $S \ll S_i$ の範囲内で理論的に求めることができる。その理論曲線を図-2に実験で示した。 $D=0.444 \text{ h}^{-1}$ の場合を除いて、かなりよい一致が得られ非定常下の転換率の変化も式(12)および式(14)から理論的に求めることが可能となる。

したがって、増殖Capacityの概念を導入することにより従来Monodモデルでは示すことのできなかった転換率が

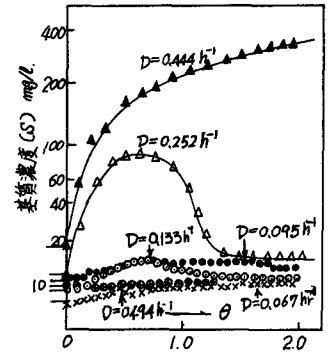


図-14 非定常時の基質濃度の変化

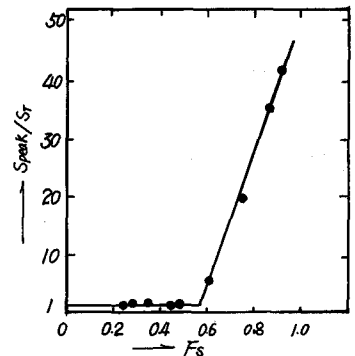


図-15 基質フラックスと基質上昇率の関係

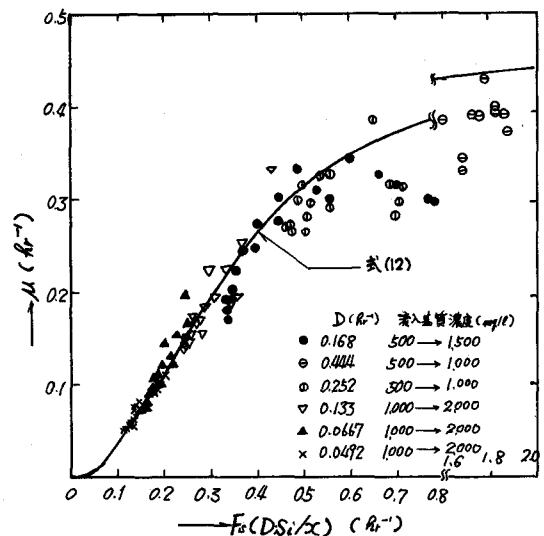


図-16 増殖Capacity曲線

変数として取り扱え、また非定常条件下の比増殖速度および転換率の挙動が同時に追跡可能になるものとする。

4-C 非定常時の代謝活性(呼吸活性) および代謝生成物の分泌に於いての結果の一例を図-17に示した。ここで呼吸活性は培養槽内のDOレベルの変化から実際の培養槽のK_Laを用い酸素収支の式から呼吸速度を計算し比呼吸速度として表示した。本例はD=0.168分⁻¹の場合で流入基質濃度を500mg/lから1500mg/lにStep変化させたものである。呼吸活性度の初期の上昇は急でありその程度は比増殖速度の急増の程度とほぼ同じであった。また急速に低下する際のパターンは、基質濃度特に培地中に分泌されたグルコース以外の物質の消失と類似しているが、比増殖速度の方はこの段階でも比較的緩慢に低下しつつ定常値に漸近している。したがって呼吸活性は、比増殖速度または、基質フラックスに比例的と考えられる部分と外部基質濃度に関連した部分の主に二つの活性部分から成っているものと思われる。

代謝生成物は、流入基質が残存している間中生成が進行しており、残存基質濃度がかなり低下すると再吸収されるようである。興味あることに、代謝生成物が上昇する時期と蓄積された細胞炭水化物が減少し始める時期に一致がみられ呼吸活性の上昇と何らかの関係があるのではないか。これらの非定常条件下の生理的な状態の変遷の把握はまだ不十分であり、増殖に関する他の因子との相互関係を明らかにしていく必要がある。

5. おとめ

活性汚濁微生物の連続培養系での非定常条件下における実験的検討の結果従来よく使用されているMonod式のパラメータが変数であることを示し、実際に問題となる基質濃度の範囲では濃度より基質フラックスが制御因子となることから増殖Capacityの概念を導入した。これにより非定常条件下における比増殖速度、転換率の基本的な二因子の挙動を同時に追跡することが可能になったと考える。すなわち式(12)で提示した増殖Capacityモデルにしたがえば、システム変数D、S_i、Xが含まれており、実際に想定されるDとS_iの任意の変化に対応しうるであろう。ただしM_{max}(したがってYに対しても)に影響を及ぼすと考えられる細胞炭水化物の蓄積、呼吸活性の上昇といった生理変化の効果、あるいは代謝生成物によるInhibition効果等に関してさらに検討を要する問題であろう。

おわりに終始有益な助言を承った当教室神山桂一助教授ならびに多大な協力をいただいた院生井上雄三君に深く感謝の意を表します。

6. 参考文献

- 1) 生沢, 山内, 加藤, 井上; 第9回下水道研究会発表講演集 昭47, PP96
- 2) 加藤, 井上; 第9回衛生工学討論会論文集 PP150-157 (1973)
- 3) D. Herbert, R. Elsworth & R. C. Telling; J. Gen. Microbiol. 14, 601-622 (1956)
- 4) 「生物化学実験法—糖質実験法」別冊 糖質核酸酵素 (1968)
- 5) A. G. Marr, E. H. Nilson & D. V. Clark; Ann. N.Y. Acad. Sci. 102 536 (1963)
- 6) R. Mor & Fiechter; Biotech. and Bioeng. 7 787-803 (1968)
- 7) A. F. Gaudy, Jr., M. Ramanathan & B. S. Rao; Biotech. and Bioeng. IX 387 (1967)
- 8) D. Ramkishna, A. F. Frederickson & H. M. Tsuchiya; Biotech. and Bioeng. IX 129 (1967)
- 9) D. S. Schaezler, W. H. Mcharg & A. W. Busch; Biotech. and Bioeng. Simp. No. 2 107-129 (1971)
- 10) C. P. L. Grady, Jr. & A. F. Gaudy, Jr.; Appl. Microbiol. 18 790 (1969)
- 11) S. Koga & A. E. Humphrey; Biotech. and Bioeng. IX 375-386 (1967)
- 12) C. J. Perret; J. Gen. Microbiol. 22 589-617 (1960)
- 13) F. F. Stoter & A. F. Gaudy, Jr.; Environmental Science & Technology 3 2 143-149 (1969)
- 14) J. C. Mclellan & A. W. Busch; Proc. 24th Industrial Waste Conference Purdue University (1969)
- 15) R. I. Mateles, D. Y. Ryu & T. Yasuda; Natur 208 PP 263-265 (1965)
- 16) 寺嶋, 加藤, 井上; 土木学会 第28回年次学術講演概要集 (1973)

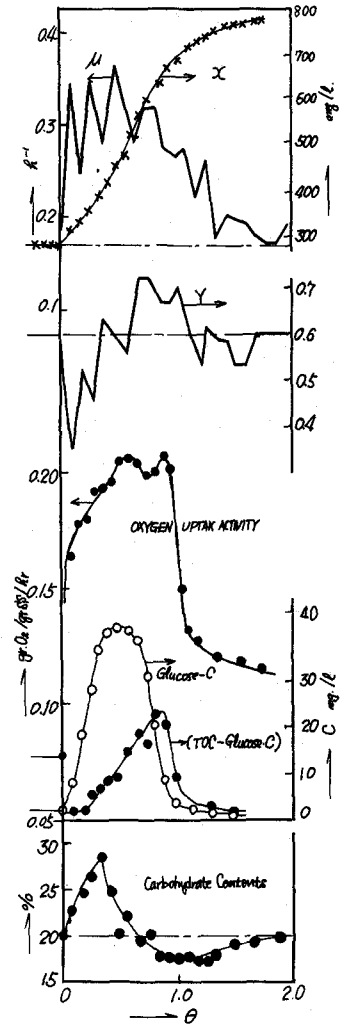


図-17 呼吸活性, 代謝生成物