

(5) 二相嫌気性消化法における酸産生過程の最適滞留時間に関する研究

東北大学工学部 松本順一郎

野池 達也

東北大学大学院 ○遠藤 銀朗

1. はじめに

従来の嫌気性消化法では、投入有機物の加水分解および揮発性有機酸発酵を行う酸産生相と、それによって生成された揮発性有機酸をメタンと炭酸ガスに変換するメタン産生相の、それぞれの基質分解機能を担う微生物群の生理特性および増殖特性が非常に異なるにもかかわらず、同一の環境中に保持している。そのため、長期間の滞留時間を必要とし、大容量の消化槽が要され、建設費等の経済性、また攪拌混合の不完全さや、それによる大量のスカムの発生などの運転操作上の問題点を有している。二相嫌気性消化法は、嫌気性消化過程を酸産生相およびメタン産生相の二相に分離し、それぞれの最適環境条件下において操作することによって、消化効率の合理的な改善を行おうとするものである。本法に関する研究は、開始されてから日も浅く、最適環境条件および動力学的評価等に関する基礎的知見は未だ殆ど得られていない。本研究は、酸産生相とメタン産生相との相分離の手法について、また分離された酸産生相を構成する細菌群の増殖の状態と、生成される揮発性有機酸の種類と量が、滞留時間に対して如何に依存するかについて、回分および連続実験によって検討し、主として酸産生相の最適滞留時間について考察したものである。

2. 実験材料、装置および方法

2-1. 種汚泥；実験に供した種汚泥は、仙台市南蒲生下水処理場より採取した消化汚泥を、下記の基質によって25~30日の水理学的滞留時間(HRT)で50~70日間培養したものを用いた。

2-2. 基質；回分実験では、デキストリン3750mg/l、カザミノ酸500mg/l、牛肉エキス1000mg/lを有機成分とし、無機栄養塩類を添加した複合培地を用いた。連続実験では、単一有機炭素源としてグルコース、単一窒素源として重炭酸アンモニウムを含み、揮発性有機酸を含まない最小培地を用いた。表-1に最小培地の成分について示した。なお、酸産生菌の増殖の形態に関する実験には強熱した珪藻土を用いた。

2-3. 実験装置；回分実験では、約1lのポリエチレン製消化槽を用い、混合液量は600CCとした。連続実験の消化槽本体は2lの塩ビ製円筒形容器を用いた、ガス攪拌による完全混合連続反応槽型の装置で、混合液容量は1lとした。図-1に連続実験装置の概略を示した。

2-4. 実験方法；＜回分実験＞7台の回分消化槽に種汚泥300CCと基質300CCを注入し、液上部の空気を窒素ガスで置換し密封した後、33℃に保たれた恒温器中に設置した。混合液の分析は、経過日数1日、2日、3日、4日、5日、7日、10日に各1台ずつ消化槽を開封して行った。＜連続実験＞平均滞留時間(SRT)約2.0日、約1.5日、約1.0日、約0.5日の4段階に変化させ、各々定常状態が得られるまで25~32日間にわたっ

表-1 連続実験に用いた基質成分

成 分	濃 度 (mg/l)
グルコース	11700
NH ₄ HCO ₃	3770
K ₂ HPO ₄	125
MgCl ₂ ・6H ₂ O	100
MnSO ₄ ・4H ₂ O	15
CuSO ₄ ・5H ₂ O	5
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.125
FeSO ₄ ・7H ₂ O	25

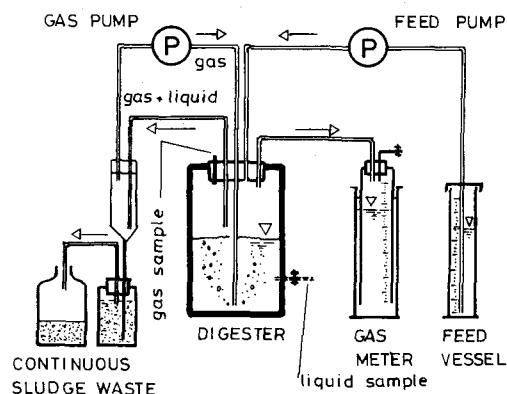


図-1 連続消化実験装置概略図

て運転した。各消化槽は35℃に保たれた恒温器中に設置した。総揮発酸の定量はカラムクロマトグラフ法、各揮発酸成分の定量はガスクロマトグラフ法、グルコースはグルコスタット法、DNAは金子による方法とインドール・ケック変法によって分析した。

3. 実験結果および考察

3-1 回分実験；図-2に混合液揮発酸濃度の経日変化を示した。これによれば合成基質からの急激な生成は、経過日数2日付近ではほぼおさまり、2～3日で揮発酸濃度はピークに達する。また図-3は、ガス発生状況の経日変化を示すものであるが経過日数2日まで炭酸ガスの発生が顕著であることが知られる。この炭酸ガスの発生は、図-2における揮発酸の蓄積状況と一致している。また経過日数3日以降ではメタンガスの発生が主体となり、この過程は揮発酸の減少と一致している。またメタンガス発生速度と揮発酸減少速度との間には関連が見られ、経過日数4～5日での揮発酸の減少に対して、高いメタンガス発生量が示されている。これらの結果は、種汚泥中に酸産生菌とメタン菌が共存しており、各細菌群が分離されて存在する場合の状態とは異なると考えられるが、嫌気性消化における、時間の経過に対する基質分解過程を示すものと思われる。

図-4にアルカリ度の経日変化を、図-5にpHの経日変化を示した。初期におけるアルカリ度の減少は、図-2に示した揮発酸濃度の増大に起因するものと思われ、その結果として、pHの低下を生じている。またメタン菌による揮発酸の分解によって、アルカリ度、pHが次第に回復しており、このようなアルカリ度およびpHの推移は、メタン菌の活性に影響を与えているものとみなされ、急激なpH低下の1日後に、一旦メタン発生量が減少し、経過日数2～4日にかけてのpH回復期に、メタンガス発生量も増大した。

以上の結果は、酸産生菌とメタン菌との混合微生物系における嫌気性消化過程を示すものであるが、総合的な嫌気性有機物分解過程は、高分子有機物→揮発酸→消化ガスという逐次的な生物分解過程であると考えられており、これらの回分実験の結果からも、揮発酸の産生のピークとメタン産生のそれとは、時間的なずれを有していることが知られる。最大の揮発酸産生速度が得られる経過時間は、揮発酸の蓄積速度より推定

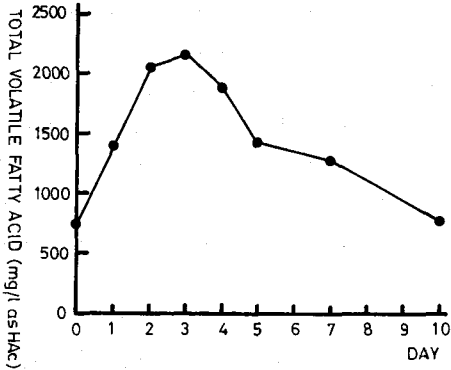


図-2 混合液揮発酸濃度経日変化

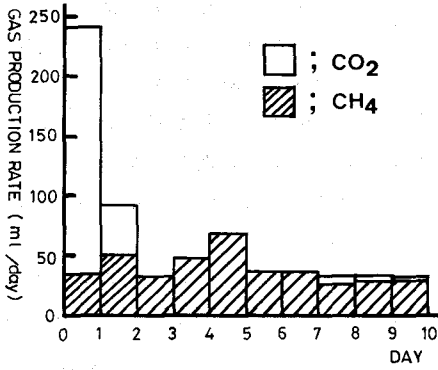


図-3 ガス発生状況経日変化

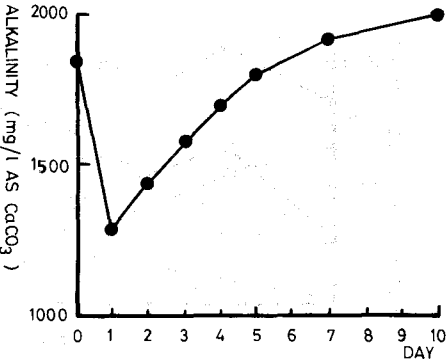


図-4 混合液アルカリ度経日変化

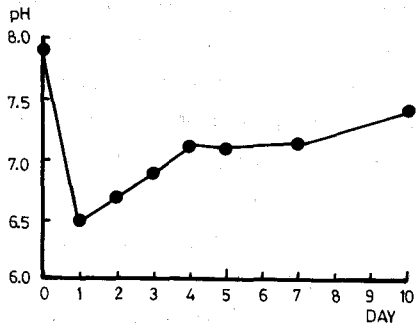


図-5 混合液pH経日変化

して、1～2日と考えられ、連続的基質投入槽での滞留時間をこの程度に設定することは、揮発酸発酵を優勢に進行させる上で有利になるものと思われる。したがって滞留時間の適切な制御は、嫌気性消化過程中の酸産生相とメタン産生相を担う各微生物群の、代謝活性および増殖活性を支配する重要な環境因子とみなされ、各相を分離する上で動力学的な手法が利用可能であることを示すものと考えられる。また以上のような速度論的に決定できる環境条件の設定のみならず、本実験結果に示されたような、pHの変化に対する揮発酸生成とメタン生成との関係は、酸産生菌およびメタン菌の生理特性の相違を示すもので、pHの低下は酸産生菌に対しては影響を示さず揮発酸の蓄積が進行するが、メタン産生はpHの変動に敏感に影響される様相が知られ、このような生理的環境条件もまた二相消化法における重要な制御因子と考えられる。

3-2 連続実験；(3-2-1)＜混合液性状およびガス発生状況におよぼす滞留時間の影響＞

表-2に各滞留時間(SRT)における消化槽混合液の性状とガス発生状況を、定常状態の平均値として示した。このガス発生状況に関しては、一般にグルコースの嫌気性分解の最終ガス組成が、 $\text{CO}_2:\text{CH}_4=1:1$ (体積比)となることから考えて、投入基質中の重炭酸塩からの CO_2 が含まれると考えられるが、メタン菌の活性が非常に低いことを示している。したがって、これらの消化槽は、実質的に揮発酸発酵を主として進行させる酸産生相にあるとみなすことができる。それゆえ、表-2に示した混合液の性状は、主に酸産性菌の代謝および増殖の特性を示すものと考えられる。

各揮発酸は、滞留時間の変化に対して、種類と濃度の両面で変化したが、本実験でのグルコースを基質として生成される主要な酸は、酢酸、n-酪酸、n-カプロン酸であることが知られ、側鎖型揮発酸および奇数炭素揮発酸の生成は微量であった。また揮発酸は混合液のpHに影響を与えることが知られ、揮発酸が高濃度の場合にpHが低下した。単一窒素源および緩衝能を与えるための基質中の重炭酸アンモニウム濃度は、有機炭素と窒素のC/N比が生下水汚泥と余剰活性汚泥との混合汚泥のC/N比に近い7.0に調整したが、pHを中性付近に維持するには不足し、pH4.71～5.02の酸性域を示した。このような酸性域のpHは、酸産生菌の代謝活性に対して影響を与えないことが、発酵された揮発酸濃度の推移より考えられる。

図-6に、発酵された主要な揮発酸である酢酸、n-酪酸、n-プロピオン酸および酢酸濃度で表わした総揮発酸の滞留時間に対する変化を示した。これによれば、各揮発酸の種類によって、最大濃度を示す滞留時間はn-カプロン酸、n-酪酸、酢酸の順に短くなっており、より高級な揮発酸ほど長い滞留時間において高濃度となることが示されている。また総揮発酸の最大濃度は、滞留時間0.95日において得られており、滞留時間0.53日では低下している。このように、揮発酸の発酵に関しては、一定の滞留時間範囲において最大濃度が得られることが知られる。本実験結果から、発酵される揮発酸の種類と濃度が、滞留時間によって異なることが示され、Andrewsらも、滞留時間の制御によって、メタン菌によって最も利用されやすい揮発酸の生成を最大ならしめることが可能であると述べている。しかし、メタン菌によって最も利用されやすい揮発酸の種類および濃度についての十分なだけの知見は、未だ報告されていない。

表-2によれば、滞留時間に対するMLVSSの推移は、滞留時間の減少につれ単純に増加することを示しており、最大ML

表-2 混合液性状およびガス発生状況

項目	SRT (日)	2.04	1.57	0.95	0.53
	pH	4.71	4.88	4.62	5.02
消化槽混合液	$\text{NH}_4\text{-N}(\text{mg/L})$	364	376	389	440
	グルコース(mg/L)	585	104	5	10
	MLSS(mg/L)	407	644	692	789
	MLVSS(mg/L)	326	489	644	741
ガス	DNA(mg/L)	9.6	10.8	18.5	20.3
	TVFA(mg/L HAc)	3503	2901	4278	3394
ガス	CH_4 (mg/日)	18	46	74	8
	CO_2 (mg/日)	811	1036	956	4129

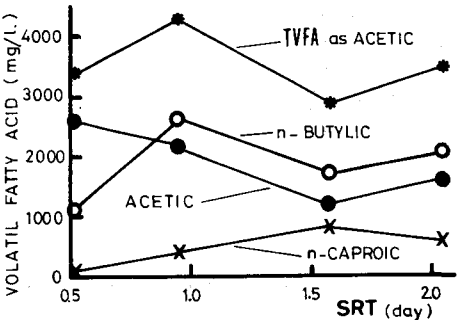


図-6 滞留時間に対する揮発酸濃度

VSSは、最小滞留時間である 0.53 日において得られた。このことは、揮発酸発酵の滞留時間に対する依存性とは異なり、酸産生菌の増殖は、実験した滞留時間範囲では滞留時間の減少に伴って活発化されることを示すものと思われる。したがって酸産生菌の菌体増殖を目的とする場合には、かなり短い滞留時間に設定する方が有利となることが知られる。

以上のように、揮発酸発酵と菌体増殖の間には、直接的な関連が見られず、Gaden による、いわゆる増殖非連動型の発酵型式³⁾に分類されることが考えられる。このことはおそらく、基質からの揮発酸発酵で得られるエネルギーが、効率的に菌体増殖に利用されないことに起因するものと思われる。したがって目的生産物が揮発酸であるか菌体であるかによって、各々の最適滞留時間の下で酸産生相を操作することは、二相嫌気性消化法を効率的に操作する上で、重要な制御因子となるものと考えられる。

(3-2-2) <揮発酸発酵および酸産生菌の増殖に関する動力学的考察>

酸産生菌の増殖について、菌体の増殖²⁾が対数相にあるとみなし、また死滅速度も菌体濃度に比例すると仮定した場合の増殖速度は次式で表現できる。

$$dX/dt = \mu X - kdX \quad (1) \quad X; \text{混合液菌体濃度 (MLVSS mg/l)}, \mu; \text{比増殖速度 (1/日)}, kd; \text{死滅速度係数 (1/日)}, t; \text{時間}$$

本実験消化槽を、ケモスタット型完全混合反応槽であるとみなした場合、定常状態における菌体と基質との2つの物質収支をとることによって、次の2つの式が得られる。

$$\mu = D + kd \quad (2) \quad D(S_o - S) = \mu X / Y_{X/S} \quad (3) \quad D; \text{希釈速度} = 1/\text{SRT (1/日)}, S_o, S; \text{流入および槽内基質濃度 (mg グルコース/l)}, Y_{X/S}; \text{増殖収率} = dX/dS \text{ (生成 MLVSS 濃度/利用 グルコース濃度)}$$

(2)式と(3)式を組み合わせると次式が得られる。

$$(S_o - S)/X = (kd/Y_{X/S})/D + 1/Y_{X/S} \quad (4)$$

また、活性の菌体量に相応する指標としての DNA の生成に関する動力学式も、まったく同様に示され、

$$r = D + \delta \quad (5) \quad (S_o - S)/DNA = (\delta/Y_{DNA/S})/D + 1/Y_{DNA/S} \quad (6) \quad r; \text{DNA の比生成速度 (1/日)}, \delta; \text{DNA の分解速度係数 (1/日)}, Y_{DNA/X}; \text{DNA に対する生成収率 (生成 DNA 濃度/利用 グルコース濃度)}$$

一方、基質消費はすべて、菌体の増殖と維持を最終目的としてなされると考えると、次式が成立する。⁴⁾

$$X(U_g + U_e + m\theta) = S_o - S \quad (7) \quad U_g, U_e; \text{菌体形成およびそのためのエネルギーとして消費される基質の利用効率 (利用されたグルコース濃度/生成された菌体濃度)}, m; \text{維持係数 (単位菌体濃度、単位時間当たり、維持のために利用されたグルコース濃度 (1/日))}, \theta; \text{滞留時間} = \text{SRT (日)}.$$

また揮発酸の生成は、菌体形成以外(増殖のエネルギーおよび維持)のために利用された基質の老廃物としてなされると考え、酸産生槽におけるメタン菌による揮発酸の利用を無視すると、次式が成立する。

$$A = A_o + CAX(U_e + m\theta) \quad (8) \quad A_o, A; \text{流入および槽内総揮発酸濃度 (mg/l as HAc)}, CA; \text{総揮発酸の産出収率 (生成総揮発酸濃度/菌体形成以外に利用されたグルコース濃度)}.$$

流入揮発酸濃度 $A_o = 0$ ゆえ、(7)式、(8)式を組み合わせると次式が得られる。

$$(S_o - S)/A = U_g(X/A) + 1/CA \quad (9)$$

また、 U_g および U_e と増殖収率 $Y_{X/S}$ には、定義に従い $Y_{X/S} = 1/(U_g + U_e)$ なる関係が成立し、次式が求まる。

$$U_e = 1/Y_{X/S} - U_g \quad (10) \quad m = (S_o - S)/(X\theta) - 1/(Y_{X/S}\theta) \quad (11)$$

図-7は、得られた実験結果を(4)式に基づいてプロットしたものである。黒丸で示したものが一連の実験結果によるものであるが、この回帰直線より、増殖収率 $Y_{X/S} = 0.123$ 、死滅速度係数 $kd = 1.42/\text{日}$ が得られた。この kd を用いて、(2)式より本実験で用いられた各滞留時間に対する真の比増殖速度 $\mu = 1.91 \sim 3.32/\text{日}$ が求まる。得られた実験結果の基質濃度と増殖速度との関係を、Monod モデル等の動力学モデルに近似できず、最大比増殖速度および基質飽和定数に関する知見は得られなかったが、Ghosh らは、グルコースを基質とする酸産生菌の最大比増殖速度は、 $300/\text{日}$ であることを報告している。また彼らの得た増殖収率 $Y_{X/S}$ は 0.173 で、本

実験で得られた値に近似している。

図-8は、実験結果を(6)式に適用し、DNAに対する生成収率 Y_{DNA}/s と分解速度係数 δ を求めるためのものである。黒丸で示したプロットより、図-7で行った操作と同様にして、 $Y_{DNA}/s = 0.00325$ 、 $\delta = 1.41/\text{日}$ が得られた。この δ を用いて、(5)式より各滞留時間に対するDNA比生成速度 r は、 $1.90 \sim 3.31/\text{日}$ と求まる。菌体の死滅速度係数 k_d とDNA分解速度係数 δ が非常によく一致し、その結果比増殖速度とDNA比生成速度とが一致することは、菌体内活性物質としてのDNAの役割を顕著に示すものと思われる。また本実験においては、MLVSS中のDNA含有率は2.21%~2.93%、平均2.69%であった。

図-9は、(9)式に基づいて、本実験における基質消費、揮発酸発酵および菌体増殖の関係をプロットしたものである。この回帰直線より、菌体形成に対する基質利用係数 $U_g = 3.55$ 、基質からの総揮発酸の収率 $C_A = 0.360$ が得られた。この U_g の値と前述の $Y_{x/s} = 0.123$ の値を(10)式に適用して、菌体形成エネルギーのための基質利用係数 $U_e = 4.62$ を得る。またこれらの値と実験値を(11)式に適用して、維持係数 m は各滞留時間について、 $9.9/\text{日} \sim 14.5/\text{日}$ 、平均 $11.9/\text{日}$ と求まる。Ghoshらは⁴⁾ $U_g = 4.63$ 、 $U_e = 1.16$ 、 $m = 6.14/\text{日}$ の値を報告しており、本実験結果と多少異なっている。また彼らは揮発酸の生成収率を、メタン菌による揮発酸の利用を無視するだけの仮定の下で、揮発酸成分各々に対して求めているが、各揮発酸間の相互転換を考慮すると、総揮発酸に対して求めることがより妥当でかつ実用的なように思われる。

(3-2-3) <珪藻土添加の、酸産生菌の増殖と揮発酸発酵への影響>

メタン菌については、槽内固形物濃度を高く維持するために、アスベストのような無機固形物を添加することによって、活性が高まることが述べられている。⁵⁾ 酸産生菌についても、槽内固形物濃度を高濃度に維持することで、増殖と揮発酸発酵の各々が活発化されるか否かについて連続実験によって検討した。珪藻土を添加固形物とし、 $50000\text{mg}/\text{l}$ の珪藻土懸濁液を $100 \sim 200\text{cc}/\text{日}$ 注入することによってMLSSを約 $5700 \sim 12000\text{mg}/\text{l}$ 程度に維持した。

表-3に、この実験による各滞留時間における消化槽混合液の性状と消化ガス発生状況を示した。表-2に示

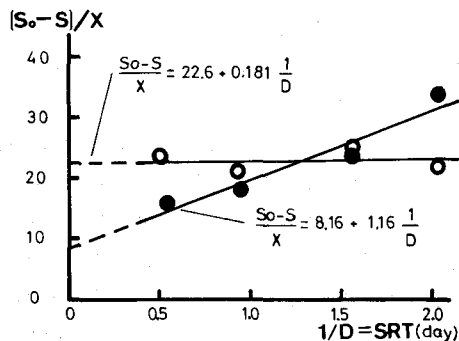


図-7 $1/D$ と $(S_o - S)/X$ の関係

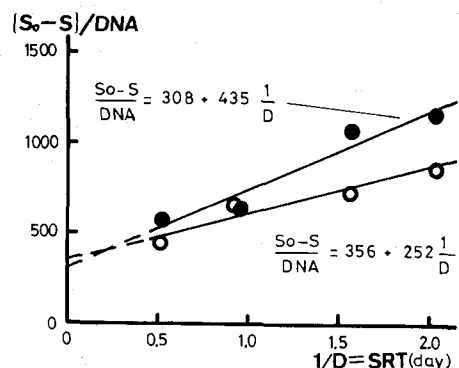


図-8 $1/D$ と $(S_o - S)/DNA$ の関係

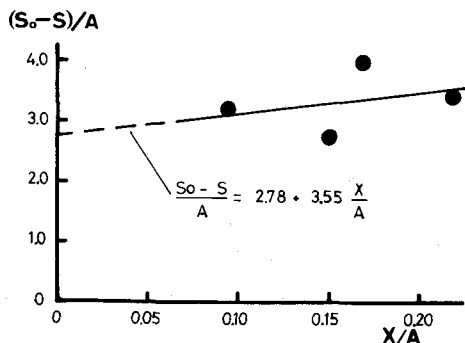


図-9 X/A と $(S_o - S)/A$ の関係

表-3 混合液性状およびガス発生状況

項目	SRT(日)	2.04	1.56	0.92	0.51
消化槽混合液	pH	4.74	4.89	4.77	4.93
	NH_4-N (mg/l)	326	385	388	425
	グルコース (mg/l)	114	32	3	11
	MLSS (mg/l)	12017	7281	5681	7570
	MLVSS (mg/l)	529	463	552	505
	DNA (mg/l)	134	160	178	266
	TVFA(mg/l HAc)	2922	3022	4251	3443
	ガス				
CH ₄ (mg/日)		86	163	10	0
CO ₂ (mg/日)		826	1024	824	5580

された結果の珪藻土無添加の場合と同様に、メタンガス発生状況からみて、メタン菌の活性が抑制され、実用上本実験消化槽を酸産生槽とみなすことができる。揮発酸の発酵については、表-2に示されたものと大きな差異が認められず、総揮発酸の最大濃度は滞留時間 092 日で得られ、各滞留時間にわたって発酵された主要な酸は、酢酸、 n -酪酸、 n -カプロン酸であった。したがって槽内固形物濃度の増大による揮発酸発酵の活発化は示されなかった。酸産生菌の増殖の滞留時間に対する依存性は、珪藻土無添加の場合と異なり、MLVSS が各滞留時間にわたって約 500 mg/ℓ の一定濃度を示した。この MLVSS は、約 1.5 日以下の短い滞留時間においては珪藻土無添加の場合よりも低く、このような滞留時間においては、珪藻土の添加によって酸産生菌の増殖の活性がむしろ低下するように思われる。

珪藻土添加に対する酸産生菌の増殖をさらに詳しく検討するために、増殖動力学的考察を行った。珪藻土添加について得られた実験結果を、(4)式に基づいて図-7に白抜きでプロットした。この回帰直線より、増殖収率 $Y_{X/S} = 0.044$ ，死滅速度係数 $k_d = 0.008/\text{日}$ が得られ、いずれも珪藻土無添加の場合よりも低下したことが知られる。この k_d を用いて得られる真の比増殖速度 μ は、各滞留時間について 0.50 ~ 1.97/日となり、珪藻土無添加の場合の対応する各滞留時間における比増殖速度に比較して、 $1/4 \sim 1/17$ とかなり小さいものであった。一方、MLVSS とは対照的に、DNA 濃度は珪藻土添加の場合よりも高く、MLVSS 当りの含有率も平均 3.62% と高いものであった。しかし、動力学的特性は、図-8 中に(6)式に基づいて白抜きでプロットした回帰直線より、DNA 生成収率 $Y_{DNA/S} = 0.0028$ ，分解速度係数 $\delta = 0.71/\text{日}$ ，比生成速度 γ は各滞留時間について 1.20 ~ 2.68/日と求まり、収率については大差は認められないが、分解速度係数および比生成速度は低下することが知られる。

顕微鏡観察においては、珪藻土の存在と非存在による増殖形態の相違は認められず、細菌はいずれも浮遊状態で存在し、珪藻土粒子への付着増殖の様子はみられなかった。また、一般に珪藻土が存在しない場合の細菌の運動性は高く、存在した場合には比較的低いものであった。

以上の結果より、槽内固形物濃度を高めることは、酸産生菌の増殖にとって有利な環境を与えず、むしろ増殖活性を抑制する結果を生ずるとともに、揮発酸発酵を活発化する上でも有効ではないことが知られ、メタン菌に対して言われている性質とは異なるものと考えられる。

4. むすび

本研究により、次のような知見が得られた。

- (1) メタン菌および酸産生菌は、生理学的および動力学的環境条件によって活性が制御される。
- (2) 酸産生菌の揮発酸発酵は、いわゆる増殖非連動型の発酵であり、増殖と発酵との最適滞留時間は異なる。
- (3) (2)に基づき、酸産生相は発酵と菌体増殖の目的に応じた、各々の最適滞留時間で操作される必要がある。
- (4) 酸産生菌はここに考察されたような、揮発酸発酵および菌体増殖の動力学的性質を有している。
- (5) 酸産生菌は付着増殖形態を示さず槽内固形物濃度の増大は揮発酸発酵と菌体増殖の効率化に有効でない。

また、本研究で得られた知見は、単一有機炭素源としてグルコース、窒素源として重炭酸アンモニウムを基質とする実験結果に基づくものであり、酸産生相における高分子有機化合物の加水分解過程を考慮していない。この過程を含めた酸産生相全体に関して、今後検討を加えていく所存である。

(参考文献)

- 1) 岩井重久，他；「下。廃水汚泥の処理」(コロナ社)，pp55，(昭和49年)
- 2) Andrews, J.F., et al; "Kinetics and Characteristics of Volatile Acid Production in Anaerobic Fermentation Process." Int. J. Air Wat. Poll., Vol. 9, pp439-461, (1965).
- 3) Gaden, E.L., Jr.; "Fermentation Process Kinetics." J. Biochem. Microbiol. Tech. & Eng., Vol. 1, pp413, (1959).
- 4) Ghosh, S., et al; "Kinetics of Substrate Assimilation and Product Fermentation in Anaerobic Digestion" J. W. P. C. F., Vol. 46, pp718-759, (1974).
- 5) Breden, C.R., et al; "The Use of Shredded Asbestos in Methan Fermentation." J. Biology, Vol. 26, pp379-388 (1933).