

(15) 生物汚泥からのリン酸溶出

○味埜 俊

花木 啓祐

松尾 友矩

1. はじめに

“リン酸は嫌気性状態で溶出する”という表現が使われるが、下水処理場では、汚泥濃縮槽での溶出が最も著しく、嫌気性消化槽での溶出は少ないとの報告がある。⁽¹⁾このことは、好気性から嫌気性への移行後、1～2日で、リン酸の溶出の大部分が完了していることを示すものである。筆者らは、沈殿池および汚泥濃縮槽において、嫌気性移行直後から起こる生物汚泥からのリン酸の溶出の性格を明らかにするために、以下に述べるような一連の実験を行なった。本論文の趣旨は、微生物活動との関連においてリン酸溶出機構をさぐることで、微生物の状態を知るための1つの指標としてATP濃度を採用したのは新しい試みである。

2. リン酸溶出機構に対する考え方

2. 1. 微生物生体中のリンの形態

Shapiro らによると、溶液中にリン酸が存在すると、活性汚泥は、生体中の C : P 比を越えたリン酸の過剰摂取をする。また、汚泥を嫌氣的に保つと過剰摂取したリン酸をはき出すが、3~4 時間後の再び供气により、リン酸は再び汚泥に取り込まれる。微生物生体中のリンのうち、このように可逆的に出入り可能な部分があると思われ、その主体はオルトリン酸であろう。また、微生物細胞内には、無機リン酸の貯蔵機構があると言われているが、これが可逆的に出入り可能なリン酸とどのような関係にあるかは不明である。

一方、生物体を構成する有機態リンとしては次の4つのものが考えられる。すなわち、i) 低分子ヌクレチオド(ATP, NADなど)およびポリヌクレオチド(DNA, RNA) ii) リン酸基を持つ代謝中間体(グルコース-6-リン酸, ホスホエノールピルビン酸など) iii) リン脂質(細胞質膜, グラム陰性菌の細胞壁) iv) リンたんぱく質, である。これらの化合物は一部のリンたんぱく質を除き, 末端リン酸基, 中間リン酸基としてリンを含む。従って加水分解により比較的容易にオルトリン酸を遊離する。

2. 嫌気性消化槽におけるリン酸の溶出

(4) 関・味埜が、東京都芝浦下水処理場の濃縮汚泥で行なった、消化槽でのリン酸溶出の温度差を調べたバッチ式実験の結果を表1に示す。5℃, 80℃でリン酸の溶出がなく、20℃, 39℃でそれが見られる。80℃で溶出がないことは、消化槽でのリン酸溶出が単なる化学現象ではなく、嫌気性菌の酵素による有機物の分解作用に起因する現象であることを示している(80℃は、酵素

表-1. 消化槽でのリン酸溶出の温度差

項 目	実 験 開 始 時	3 日 後			
		5℃	20℃	39℃	80℃
pH	6.54	6.24	5.36	5.33	6.55
PO ₄ -P (ppm)	61.3	65.3	1525	1818	68.7

起因する現象であることを示している（80℃は、酵素の作用限界上限を越えた温度である）。

また、花木・高橋⁽⁵⁾によると、嫌気性消化槽での濃縮汚泥からの $\text{NH}_4\text{-N}$ の溶出は、2週間のオーダーで起きているのに対し、関・味埜⁽⁴⁾によると、同じ条件下でリン酸の溶出は2日以内にほぼ終了している。これはNとPの形態の差、すなわち、Nはたんぱく質を中心とした複雑な化合形態であるの比べ、Pは先に述べたようなリン酸基を基本とした簡易な構造であることに対応して、両者の分解時間の差が生じているものと思われる。すなわち、消化槽における濃縮汚泥からのリン酸の溶出は、嫌気性菌による有機物分解反応によって生じていることが推察される。

2. 3. リン酸溶出機構に対する考え方

以上のことをまとめると、次のように考えることができる。生物汚泥が嫌気状態に移行した時に生じるリ

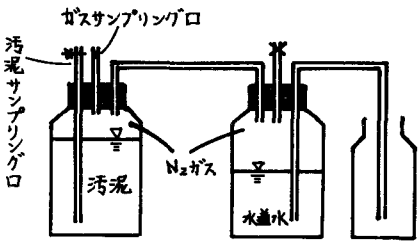
ン酸の溶出機構には3つの形態がある。すなわち、

- i) 嫌気性移行後ただちに生じる溶出で、好気性生物が過剰摂取したリン酸をはき出す溶出、おそらく可逆的である。(以後“初期溶出”と呼ぶ。)
- ii) 好気性微生物の溶菌、すなわち自己分解による、生体中のリン化合物からのリン酸溶出。おそらく不可逆的である。(同“自己分解による溶出”)
- iii) 好気性生物死滅後、嫌気性生物の加水分解作用により有機態のリン化合物が分解され、リン酸が遊離してくる溶出。不可逆的である。(同“加水分解による溶出”)

ここで、“自己分解による溶出”および“加水分解による溶出”は、それぞれを支配する酵素の作用によるものだが、“初期溶出”に対して、生物的な制御機構がどの程度働いているかは不明である。本論文は、これらの3つのリン酸溶出機構の性格を明らかにすることを試みたものである。

3. 実験の材料、装置、および方法

実験には、当研究室でスキムミルクにより飼育した活性汚泥を用いた。実験は、リン酸溶出の概要をつかむための“溶出実験(R)”，リン酸溶出に対する温度効果を確認するための“温度差実験(T)”，溶出に対する生物の寄与を調べるための“滅菌実験(S)”および、溶出の可逆性を調べるための“再ばっ気実験(A)”の4つを行なった。各実験の概要を表2にまとめる。



図－1. 実験装置概略図

分析は、アスコルビン酸法による PO_4-P ，電極法によるpH およびORP，ガスクロによる揮発酸，ATPフォトメーターによるATP濃度（混合液および汙液）について行ない、また実験開始時のMLSSも測定した。この他，“溶出実験”では、適宜、重クロム酸カリによるCOD，MLVSS，ガス発生量およびガス組成も分析した。ATPの抽出はTris 緩衝液による煮沸法で行なった。ろ過はすべてTOYO. 5Cを用いている。

4. 実験結果

表－2 実験の概要のまとめ

(1) 溶出実験：R－1，R－2の結果をそれぞれ図2，図3に示す。

(2) 温度差実験：結果を図4に示す。リン酸の溶出現象に対して温度が大きな影響を持っていることがわかる。12hrまでは $3℃ < 20℃ < 37℃ < 70℃$ の順で溶出速度が速くなっているが、12hrを過ぎると70℃においてリン酸の溶出は停止しており、先の関・味埜の結果と同様な傾向がみとめられる。

実験名	記号	装置	温度	継続時間	概要
溶出実験	R－1	図1に示す	37℃	7 day	無接種 36～38℃に保った水槽内に入れる
	R－2		〃	〃	種汚泥と活性汚泥を1：1の比で混合(接種)
温度差実験	T－3	図1に示す	3℃	4 day	冷蔵庫内に保つ
	T－20		20℃	〃	恒温室内に保つ
	T－37		37℃	7 day	R－1と同一条件
	T－70		70℃	〃	70℃の乾燥器内に保つ
滅菌実験	S－C	ふ卵ビン採水ごと1本ずつ開封	37℃	24 hr	R－1と同一条件
	S－Ht		〃	〃	100℃の水浴中に10分間熱滅菌後37℃に保つ
	S－Hg		〃	〃	昇こう700ppmで滅菌後37℃に保つ
	S－B		100℃	〃	沸とう水浴中に保つ
	S’－Ht		37℃	〃	6時間経過後100℃10分滅菌
	S’－Hg		〃	〃	6時間経過後昇こう350ppmで滅菌
再ばっ気実験	A－6	3ℓのガラスビン	嫌気37℃	1 day	6時間嫌気に保ったあとと再ばっ気
	A－24	〃	好気室温	1 day	24時間嫌気に保ったあとと再ばっ気

※芝浦処理場の消化汚泥をミルクで飼育した活性汚泥に馴致させたもの。

(3) 滅菌実験：結果を図5に示す。熱滅菌を行なったものについてはリン酸溶出量がS-Cより少なくなっていることがわかる。昇こうで滅菌したものでは、ORPの上昇(500 mV以上), pHの低下(5前後), 多量のリン酸溶出(S-Cと同等)がみられ、汚泥の変質が推測される。考察の対象とならないので図からはずした。

(4) 再ばっ気実験：結果を図6に示す。6 hr 嫌気性に保った活性汚泥を再ばっ気したA-6では、その後2 hrで溶出したリン酸のほとんどが汚泥に再吸収されているのに対し、24 hr 嫌気性に保った活性汚泥を再ばっ気したA-24では、1日を経過してORPが回復しても、なお溶液中にリン酸の残存がみとめられる。

5. 考察

5. 1. ATP濃度について

R-1, T-37, S-Cなどの標準的なサンプルで見ると、ATP濃度は、はじめほぼ一定か

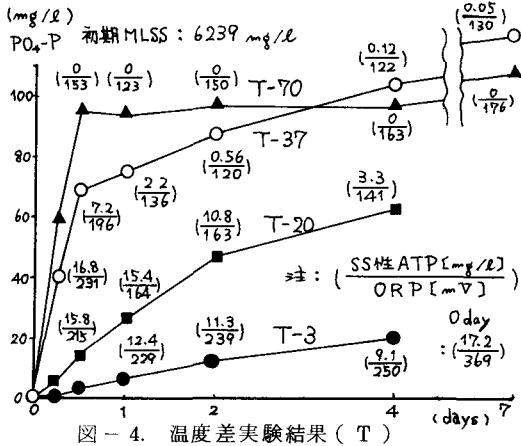


図 - 4. 温度差実験結果 (T)

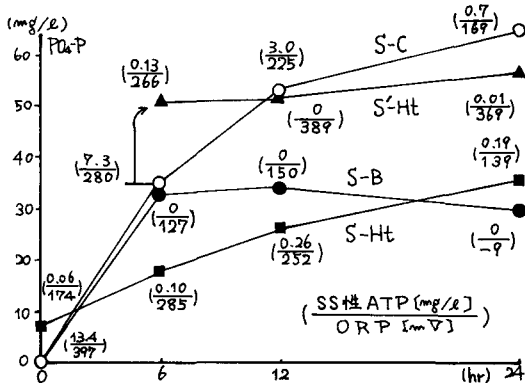


図 - 5. 滅菌実験結果 (S)

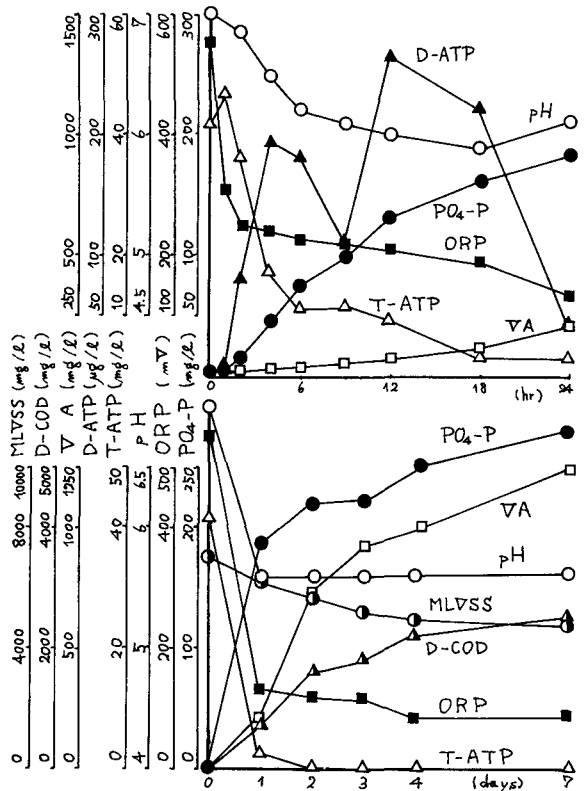


図 - 2. R-1 実験結果

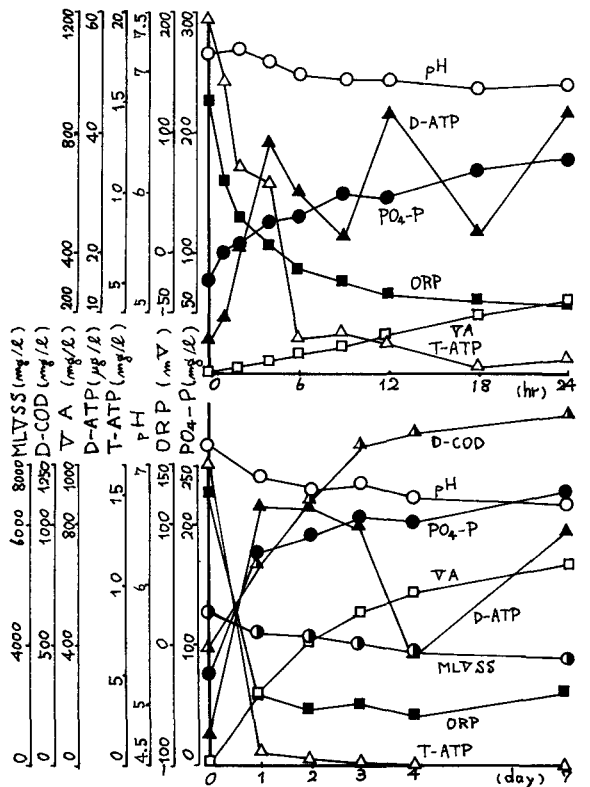


図 - 3. R-2 実験結果

やや増加の時期があり、その後急激に減少して1日で初期濃度の1/10程度になる。ATP濃度は、生物数が同じでも生理的狀態により大きく異なるものであるから、初期のATP増加が生物量の増加を示すものとはかぎらない。嫌気性消化汚泥（R-2の種汚泥）だけのATP濃度は50 ppb程度であるから、T-ATPで定量されるATPのほとんどすべては好気性微生物に由来するものである。従ってT-ATPの減少は、好気性微生物の減少を示すものである。一方、R-1を見ると、D-ATPはT-ATPの減少率の大きいところで高濃度を示し、T-ATPの減少が停滞しているところでは低濃度になっている。このことから、好気性生物の死滅過程で溶菌により、生体中から溶液中にATPが溶出してきていることがうかがえる。また逆に、D-ATPの濃度が高いところでは、好気性生物の自己分解が著しいと言える。

5. 2. “初期溶出”について

T-37では、6hrまでにATPの減少がほとんどなく、またA-6では、ATPはむしろ増加しているのに、それぞれ39.7 ppmおよび36.1 ppmのPO₄-Pの溶出が見られる。これは生物量の減少を伴わない溶出であり、“初期溶出”にあたるものと考えられる。

再ばっ気実験によると、A-6では、再ばっ気開始後2hrで、溶出したリン酸のほとんどが汚泥に再吸収されており、このような、可逆的に出入りするリン酸があることは、好気性生物の死滅によらない“初期溶出”のような機構の存在を裏づけるものであろう。またA-24において、ORPの回復後もPO₄-Pが溶液に残っていることは、ATPの減少すなわち好気性生物の減少がリン酸の再吸収速度の低下につながることを示している。すなわち、リン酸の“初期溶出”およびその再吸収は、好気性微生物の活動に深いかかわりを持っていると考えられる。(図7)

T-37やA-6を除いては“初期溶出”をはっきりと分離することはできなかった。おそらく、嫌気性移行後、初期に、“自己分解による溶出”や場合によっては“加水分解による溶出”と並行して起こっているものと思われる。T-20を見ると1 dayまでのATP減少は小さいから、常温では“初期溶出”の時期が1日近く続いたあと次の段階に移行してゆくものと思われ、沈澱池における溶出は“初期溶出”が中心であることが推定される。

5. 3. “自己分解による溶出”について

ATP濃度が著しく減少する時期は、好気性生物の自己分解が起こっている時期と考えられるが、この時期に好気性生物からのPO₄-P溶出が生じていると考えるのが自然である。これが“自己分解による溶出”である。しかし、今回の実験結果からは“自己分解による溶出”を裏づけるような情報は得られなかった。表3はATP減少量あたりのPO₄-P溶出量の値を3つの例についてまとめたものだが、表の値にはばらつ

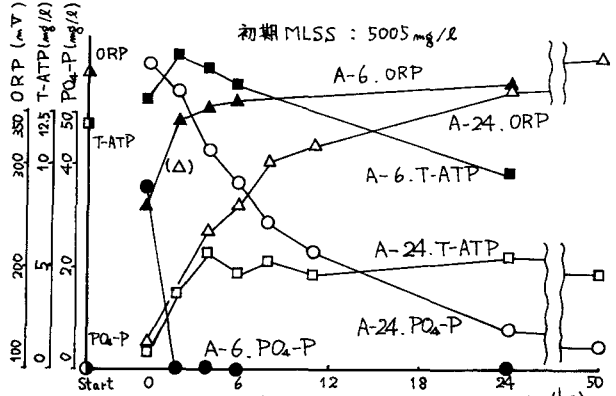


図-6 再ばっ気実験結果 (A-6, A-24,) (hr)

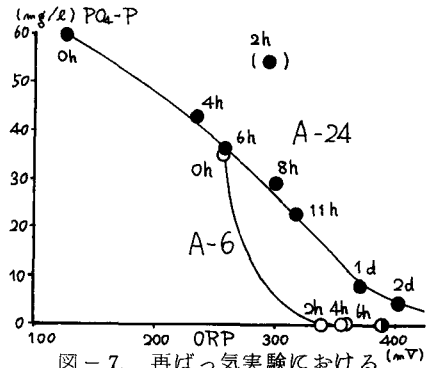


図-7. 再ばっ気実験における ORP と PO₄-P 関係図

表-3. ATP減少量あたりの PO₄-P 溶出量 (mg P / mg ATP)

	P-1	T-37	S-C
0~6 hr	2.4	99.	5.7
6~12	6.9	8.0	4.2
12~24	9.1	1.4	5.0
1~2 day	18.4	6.8	—
2~4	113	40.5	—
4~7	2000	198	—

きが多く一定の特性はみられない。またR-2の4~6 hrでは、T-A T Pが激減しているにもかかわらずこの間のリン酸溶出はむしろ小さくなっている。これらのことから、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 溶出に対しては、今回の結果の範囲では、“自己分解による溶出”よりそれ以外のものの影響が大きいことが推察される。しかし、A T Pの分析精度、A T P減少がほんとうに好気性微生物の自己分解過程を示しているかどうか、など問題点は多く、“自己分解による溶出”の検証は今後の課題である。

5. 4. “加水分解による溶出”について

図8に、R-1、R-2より求めたORPと $\text{PO}_4\text{-P}$ の関係を示す。R-1における2 hr~18 hrと1 day以後、R-2における12 hr以後では、ORP低下速度が小さくなっていることに対応してグラフは立ち上がっている。実験後期において、ORPの低下が止まっているにもかかわらず、リン酸の溶出が続くという現象が両者に共通して見られるが、これは後期の溶出が単なる化学的現象ではなく、有機態リンの分解によってもたらされていることを示唆している。これが“加水分解による溶出”にあたるものである。

表4にR-1、R-2の揮発酸発生速度（揮発酸濃度とメタン発生量から計算）、図9に $\text{PO}_4\text{-P}$ 溶出速度を示す。表4によると、R-2でははじめから、R-1では18 hr以後、酸生成が活発になっており、嫌気性微生物の活動は、18 hrまではR-2のほうがさかんだが、18 hr以後は、両者ほぼ同程度になっていることが推定される。これは、18 hrまではR-2のほうがリン酸溶出速度が大きく、18 hr以後は両者の溶出速度がほぼ等しくなっていることに対応するものである。すなわち、植種により、はじめから嫌気性微生物活動のさかんなR-2では、“初期溶出”と“加水分解による溶出”が並行して起こっているので溶出速度が大きく、また、R-1、R-2とも“加水分解による溶出”のみとなった18 hr以後では、両者のリン酸溶出速度が等しくなっていると考えることができる。

嫌気性菌の作用による、リン酸の“加水分解による溶出”という機構が存在するのならば、滅菌により、リン酸溶出は止まるはずである。これを調べたのが温度差実験および滅菌実験である。温度差実験において滅菌効果をねらったT-70では、初期の溶出は大きいものの、12 hrで溶出が止まり、3 day付近でT-37の溶出量がT-70を追い越している。T-70の結果は、“加水分解による

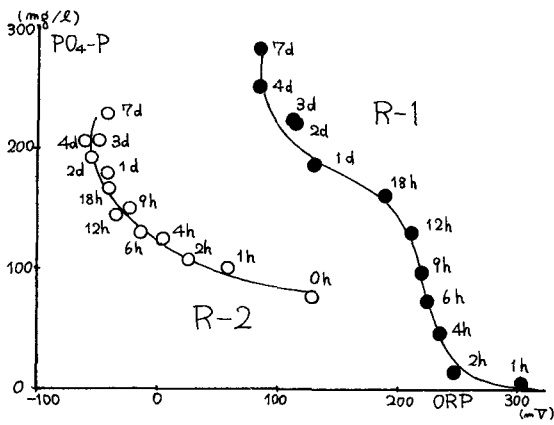


図-8. 溶出実験におけるORPと $\text{PO}_4\text{-P}$ の関係

表-4. 投入生物汚泥あたりの
V A発生速度 as COD
($\text{mgVA as COD/gMLSS/hr}$)

時間	R-1	R-2
0 ~ 6 hr	0.94	2.80
6 ~12	0.85	4.20
12 ~18	0.98	3.58
18 ~24	3.65	3.50
1 ~ 2 day	3.83	3.35
2 ~ 3	1.83	1.83
3 ~ 4	0.56	2.05
4 ~ 7	0.65	0.85

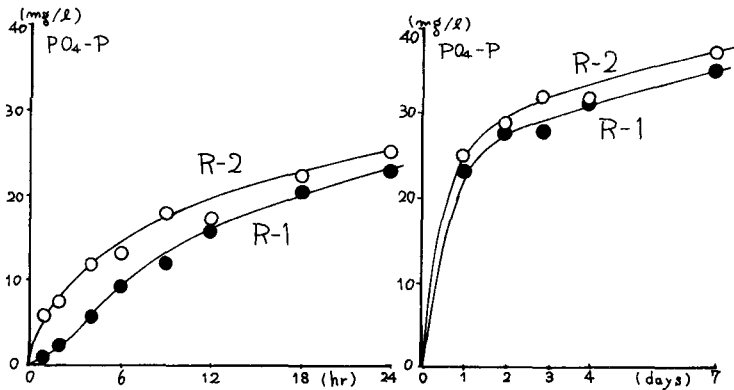


図-9. 投入した生物汚泥あたりの $\text{PO}_4\text{-P}$ 発生量 (R実験)

溶出”が滅菌により停止することを示している。T-70において12hrまでに溶出した100ppm近いリン酸は，“初期溶出”および“自己分解による溶出”で溶出すべきリン酸，および，熱を加えたことで非生物的に加水分解を受けたリンの合計であると考えられる。

次に滅菌実験の結果を見ると，まず，滅菌を行っていないS-Cの溶出速度が最も速いことがわかる。100℃の水浴中に保ったS-Bでは，6hrまでに30ppm付近で $\text{PO}_4\text{-P}$ の溶出が止まっており，T-70とよく似た傾向をみせている。T-ATPとD-ATPの差であるSS性ATPがゼロであり，揮発酸の発生も少ない(26ppm)ことから滅菌は充分であったと思われ，生物活動の停止がリン溶出の停止につながることを示されている。嫌気性移行後6hrに100℃で10分間熱滅菌したS'-Htでも，滅菌後SS性ATPがゼロになったことと対応して，滅菌後の溶出が止まっている。これに対し，0hrで100℃10分の熱滅菌を行なったS-Htでは，24hrにおいて294ppmものV.A発生がみとめられ(S-Cは159ppm)，SS性ATPも0.2~0.3ppm残っていることから嫌気性菌に対する滅菌が不完全であったことがうかがえるが，それに対応して $\text{PO}_4\text{-P}$ の溶出も24hrまでひきつづき起こっている。ただし，溶出量はS-Cの半分程度である。以上のように，滅菌が“加水分解による溶出”を停止させることは，かなりはっきりと示された。

6. まとめ

(1) 生物汚泥からのリン酸の溶出は“初期溶出”，“自己分解による溶出”，“加水分解による溶出”の3つのメカニズムにより説明することが可能である。

(2) “初期溶出”したリン酸は再び気により再び汚泥にとり込まれる。(初期溶出の可逆性)

(3) “自己分解による溶出”については現象をはっきりととらえることができなかった。

(4) 熱滅菌により微生物活動を停止させると，リン酸の“加水分解による溶出”も停止する。

(5) ATPの分析は生物量や汚泥の生理的状态を推定する上で有効であったが，好気性汚泥と嫌気性汚泥でATPレベルが極端に異なるなど，その意味についてはまだ不明確な点が多く，研究の蓄積が待たれる。

(6) 実際の下水処理場では，沈殿池で，“初期溶出”が起こりつつある時点で汚泥はひきぬかれ，濃縮槽へ移されると考えられる。濃縮槽では嫌気状態が生じており，嫌気性微生物の活性が比較的高いので，植種と同じような効果により“加水分解による溶出”がただちに進行するであろう。これが濃縮槽でリン酸の溶出が多くなる原因と思われる。濃縮槽で溶出しきれなかったリンは消化槽において溶出することになる。

7. おわりに

活性汚泥からのリン酸の溶出機構に対して，生物的な側面からのアプローチを試みたが，まだ現象把握の段階であり，仮説的な議論に終始してしまった。リン酸溶出機構のモデル化への1つの資料として，諸賢の御検討をいただければ幸である。今後は，個々の現象の持つ性格をよりいっそうはっきりさせてゆくつもりである。

〔参考文献〕

- (1) 中西他「下水処理場の機能解析(その2)」第13回衛生工学研究討論会講演論文集(1977)
- (2) Shapiro他“Metabolic Uptake of Phosphorous by Wastewater Organism”JWPCF, Vol. 37, No. 6(1965)
- (3) Shapiro他“Anoxically Induced Release of Phosphate in Wastewater Treatment”JWPCF, Vol. 39, No. 11(1967)
- (4) 関・味埜「嫌気性状態におけるリンの挙動に関する研究」東京大学卒業論文(1978)
- (5) 花木・高橋「下水汚泥の嫌気性消化に関する考察」第13回下水道研究発表会講演集(1976)