

(10) 活性汚泥の代謝過程および培養条件による汚泥内リン化合物の変化

東京大学工学部 学 ○味 埜 俊

” 正 松 尾 友 矩

1. はじめに

筆者らは、これまで Schmidt-Thannhauser-Schneider 法 (STS 法)⁽¹⁾ を用いて、活性汚泥内部のリン化合物を分画定量することを手がけてきた⁽²⁾。そのねらいは、活性汚泥法の処理過程 (汚泥処理まで含む) でのさまざまなリンの挙動に対して、生物生理的な意味づけをすること、さらに、汚泥内のリン分布によって、ある程度の汚泥特性の分類評価をすることである。そのためには、処理過程で生じるリンの取り込み、放出が、汚泥内リン分布のどのような変化によって生じるのか、また、ある一定の汚泥特性やリン分布を持つ汚泥が、どのような培養条件によって形成されるのか、を明らかにしてゆくことが必要と考える。

以上のような立場から、本論文では、主として2つの内容を扱った。1つは、基質代謝過程における汚泥内リン分布の変化であり、もう1つは、培養条件として、リン投与量、有機基質投与量、および、SRT を変えた時の汚泥内リン分布の差異である。筆者らは、汚泥特性を評価する上で、ポリリン酸が重要な意味を持つ物質であると考えており、本論文での考察も、ポリリン酸を中心として行なった。

2. STS 法について

STS 法による汚泥内リン化合物分析手順を図-1に示した。抽出後の遠心分離はすべて8000 r. p. m. 0℃10分で行なった。Cold-PCA Fr.、および、Ethanol Fr.には生体中の遊離低分子化合物が抽出され、Lipid Fr.には脂質が抽出される。また、Hot-PCA Fr.には、核酸、高分子ポリリン酸の他、リン化合物ではないが高分子糖類も抽出される。Protein Fr.は蛋白質の画分であるが、蛋白質の一部は他の画分 (Hot-PCA Fr. など) に混合する場合もあるとされ、全蛋白質を代表するものではない。Residue Fr.は、全抽出を行なった後の残留画分である。

各画分について過硫酸カリ分解法によるT-P进行分析した。リン酸の定量にはアスコルビン酸法を用いている。Hot-PCA Fr.では、ジフェニルアミン法によるDNA (DNA [Di])、紫外吸光度法による全核酸 (TNA [UV]) を定量し、その差としてRNAを求めた (RNA [UV-Di])。核酸量は、核酸中のリンを9%としてリン量に換算して表

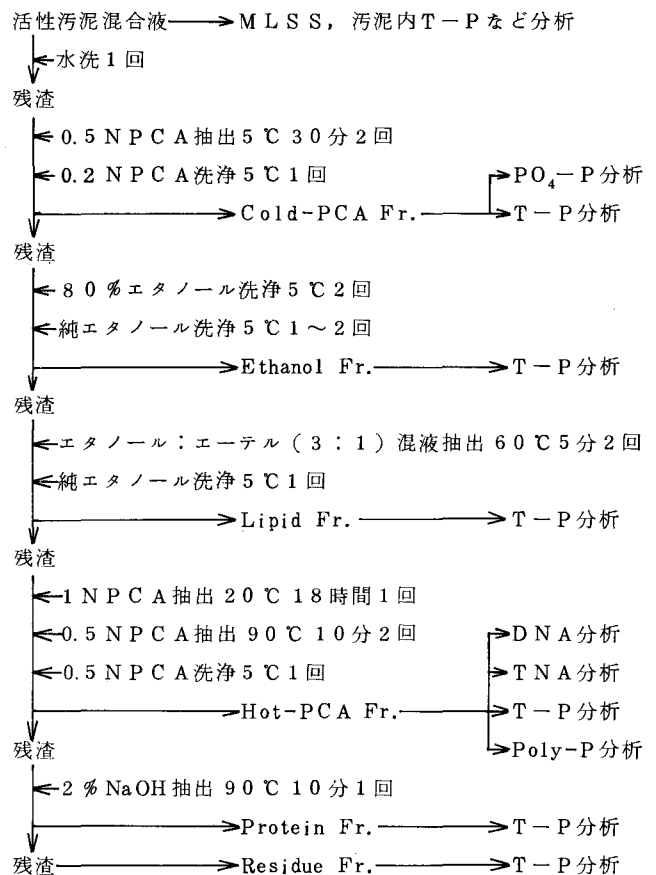


図-1. STS 法による汚泥内リン化合物分析手順

表一. S T S 法を用いた汚泥内リン化合物分析例

汚 泥	A-1	A-2	B	C	D	E-1	E-2	F	G	H
	バッチグルコース汚泥		バッチ ミルク汚泥	バッチ LAS汚泥	リン制限 汚泥	連続グルコース汚泥 返送汚泥		A/O汚泥 バルキング汚泥	実処理場 汚泥	嫌気性 消化汚泥
有 機 基 質	グルコース 500mg/ℓ/d ペプトン 50mg/ℓ/d		ミルク 500mg/ℓ/d	グルコース 200mg/ℓ/d LAS 1mg/ℓ/d	Aに同じ	グルコース 100mg/ℓ/d		Eに同じ	生下水	ミルク 1000 mg/ℓ/d
培 養 方 式	1日1回の Fill & drow		Aに同じ	Aに同じ	Aに同じ	連続フィード多段槽		Eに同じ	標準活性 汚泥法	Aに同じ
S R T	8 days		∞	100日前後	8 days	8 days		8 days	約10 days	40 days
MLSS	1730	2119	3912	2528	1536	8338	547	1666	1435	1670
汚泥内T-P	12.57	15.68	5.71	10.51	8.28	9.87	10.22	14.99	26.24	11.01
C-PCA Fr. T-P	1.51	1.27	1.07	1.10	0.68	1.33	1.43	1.86	11.17	5.99
Ethanol Fr. T-P			0.20	0.59				0.82	0.52	0.20
Lipid Fr. T-P	1.81	1.10	0.13	0.13	1.01	0.72	0.76	0.12	0.13	0.05
H-PCA Fr.										
DNA-P(Di)	1.13	3.82	0.92	—	1.40	1.04	0.49	0.79	0.61	1.37
TNA-P(UV)	4.81	5.27	2.77	4.36	3.86	6.68	7.15	5.72	3.92	2.04
RNA-P(UV-Di)	3.68	1.45	1.85	—	2.46	5.64	6.65	4.93	3.32	0.67
T-P	8.48	10.76	2.85	6.15	4.43	5.49	6.05	8.76	8.46	2.94
Poly-P	2.63	4.83	1.47	4.06	1.06	1.94	1.65	5.84	6.20	1.14
(T-Poly)-P	5.85	5.93	1.37	2.10	3.37	3.54	4.41	2.92	2.27	1.80
Protein Fr. T-P		0.81	0.78	0.81		2.39	1.66	2.13	3.17	0.74
Residue Fr. T-P	0.80	0.26	0.34	0.33	1.91	0.22	0.15	0.35	0.23	0.31
合 計 値	11.97	14.20	5.42	9.13	7.69	10.15	10.00	14.04	23.68	10.23

示してある。また、H-PCA Fr. では、活性炭処理により核酸を除去した上ずみ中のT-Pを定量し、これをポリリン酸量(Poly-P)とした。従って、(T-Poly)-Pは、核酸中のリン量であり、TNA-Pに相当するものである。

表一に、これまで得られたSTS法による分析結果の代表例をいくつか示した。汚泥内T-Pは5.71～26.24(mgP/g MLSS, 以下同)と幅があるのに対し、C-PCA Fr. やDNAのように、若干の例外を除き、汚泥間の差異の小さな画分と、RNA、ポリリン酸のように、汚泥による差異の大きな画分があり、とくにポリリン酸は汚泥間の差異が著しい。ポリリン酸量は、A. グルコース培養汚泥(2.63～3.79)より、B. ミルク培養汚泥(1.47)で小さく(おそらくミルク中のリンが過少なため)、また、A. Fill & drow 汚泥(2.63～3.79)より、E. 多段槽による連続培養汚泥(1.65～1.94)で小さい。さらに、D. リン投与を制限した汚泥でも他の画分に比べポリリン酸に著しい減少がみられる。ポリリン酸量がとくに多かったのは、G. 実処理場汚泥(6.20)と、F. 嫌気-好気式脱リンプロセス(A/Oプロセス)⁽³⁾の実験槽から得た汚泥(5.84)であった。低DOでの培養、あるいは、嫌気にさらされる過程を経る培養において、ポリリン酸は増加するようである。

以上のように、培養条件の違いは、ポリリン酸をはじめとして、STS法の各画分にかなり端的に現われるので、汚泥内リン分布の差異による汚泥特性の評価は可能であり、有意であると考えられる。

3. 基質代謝過程における汚泥内リン分布の変化

グルコース、ペプトンを有機基質とし、1日1回のFill & drow で培養した汚泥(表一のA汚泥)を用

いて、基質投与後の代謝過程における汚泥内リン分布の変化を、バッチ実験により検討した。分析はSTS法の他、上ずみ $\text{PO}_4\text{-P}$ ($\text{D-PO}_4\text{-P}$)、および、アンスロン硫酸法による上ずみグルコース (D-Glucose)、汚泥内多糖類 (Cell Saccharide) についても行った。実験結果を図-2に示す。

投与した 500 mg / l のグルコースは、最初の 30 分で上ずみから除去され、汚泥内多糖類は 0:14 までの間に急増している。0~0:14 においては、ポリリン

酸の減少と低分子リン化合物 (C-PCA Fr., Ethanol Fr.) の増加がみられ、また、汚泥は培地からのリン取り込みを行っていない (上ずみ $\text{PO}_4\text{-P}$ の減少なし)。このことから、基質代謝初期のリン源は、培地リンではなく、汚泥内ポリリン酸であり、生合成を行なうための低分子リン化合物は、ポリリン酸をリン源として合成されていることがわかる。ある種の微生物にとっては、ポリリン酸は単なる“余剰リン”ではなく、生合成初期に代謝を円滑に行なうためには必須の物質かもしれない。

その後、汚泥内多糖類の減少と平行して、汚泥によるリン摂取が始まり、24 hr までの間、汚泥内 T-P (Cell T-P) は増加した。これは、DNA, RNA, ポリリン酸の増加によるものであった。この間、低分子リン化合物は除々に減少している。摂取したグルコースを用いた生合成は、9~24 hr 近くまで続いたものと思われる。

1 day 以後は、自己酸化期であり、Protein Fr. を除き、いずれの画分でもリン量の減少が見られ、これに伴ってリン溶出が生じた (上ずみ $\text{PO}_4\text{-P}$ 増加, 汚泥内 T-P 減少)。Protein Fr. は、この実験に限らず、多くの場合に、汚泥内 T-P の減少時に増加する傾向が見られるが、原因は不明である。

本実験では、基質代謝の過程で生じたリンの取り込み、放出に伴う、汚泥内の各画分のリン量の変化が観察されたが、リン取り込み、溶出に対する寄与は、核酸、および、ポリリン酸が大きかった。

4. 培養条件による汚泥内リン分布の変化

(1) リン制限下での培養

汚泥のリンにかかわる特性に、直接的に影響を及ぼす因子が、培地のリン存在量である。リン欠乏の影響

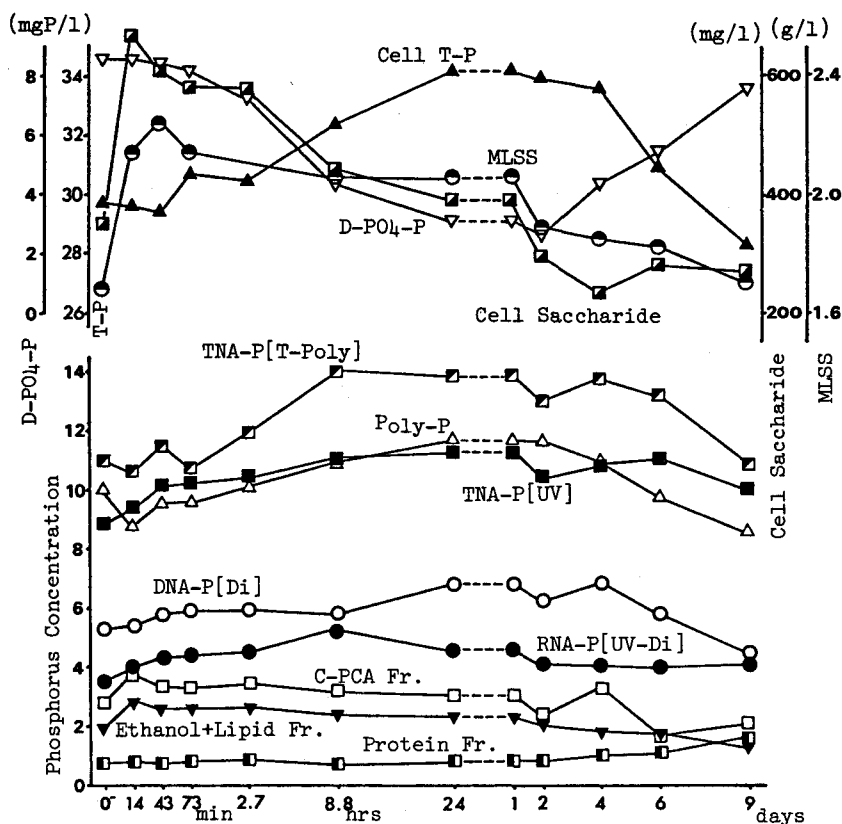


図-2. 基質投与後の汚泥内リン分布の変化

を調べるため、A汚泥(表-1)を用い、ある時点から、他の培養条件は変えず、リン投与のみを中止して、その後の汚泥内リン分布の変化を見た。結果の一例を図-3に示す。また、リン制限による汚泥の代謝活性への影響をあわせて見るため、グルコースの上ずみからの除去速度を測定した結果を図-4に示す。

汚泥内T-Pの減少に伴ない、Protein Fr.を除く各画分でリン量の減少がみられたが、DNA、ポリリン酸で減少が著しく、Lipid Fr.+Ethanol Fr.

RNAで減少は小さい。Protein Fr.は逆にリン量の増加がみられる。図-3の例では、リン制限直後からポリリン酸の涸渇を待たずにDNAの減少が生じているが、他の例では、初期のDNA減少は小さく、3~7日経過した時点(ポリリン酸が約1mgP/g MLSSまで減少した時点)で、DNAの急減(0.5mgP/g MLSS程度)が生じる場合もみられた。また、グルコース除去速度も、リン制限直後から低下が生じているが、他の例では、DNAの急減する時期に、これに伴って除去速度の低下が観察されており、グルコース除去速度の低下は、DNAの減少に依存しているようである。一般に、ポリリン酸の減少→リンストックの涸渇→DNAの減少→代謝活性の低下という経過をたどられるが、ポリリン酸を持つ生物と持たない生物が汚泥中に共存する場合、ポリリン酸を持たない生物では、リン制限直後からDNAの減少が生じるのであろう。また、ポリリン酸が必須的な役割を果たす菌においては、体内ポリリン酸の減少が、直接、代謝活性の低下につながることもあると思われる。

図-4の実験は、当初、代謝活性の低下する時点での汚泥内リン分布から、“必須リン”と“余剰リン”を分離しようという試みであったが、このような方法では、混合培養系においては、両者は容易には区別できぬものである。

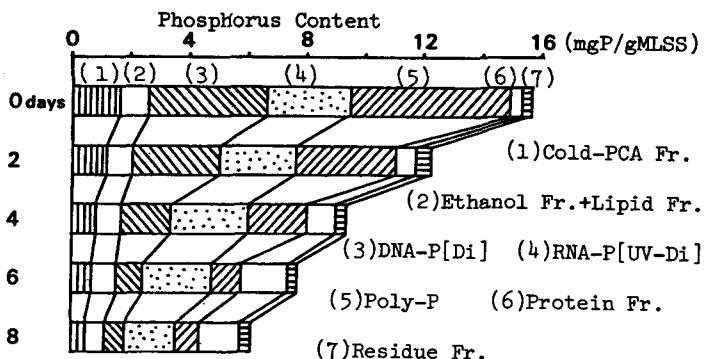


図-3. リン制限後の汚泥内リン分布の変化

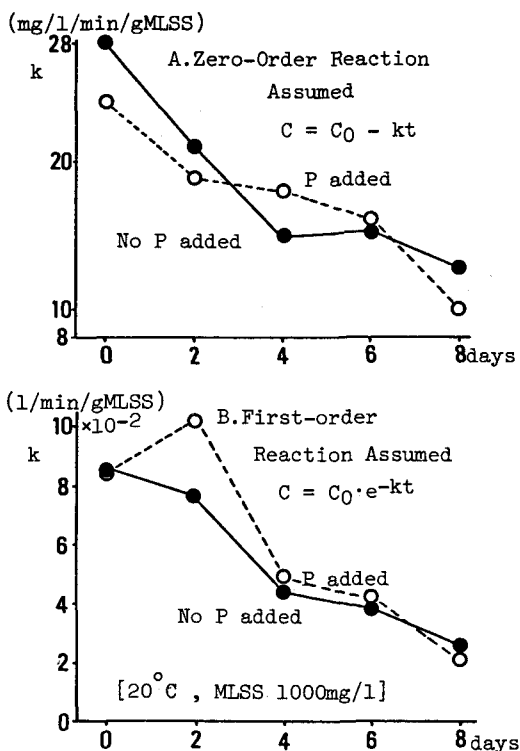


図-4. リン制限後のグルコース除去速度変化

(2) 基質投与量およびSRTによる汚泥内リン分布の変化

SRTを一定にして基質投与量(容積負荷)を変えた場合、F/M比に応じてMLSSが決まるので、MLSSは変わってもF/M比はほぼ一定となる。一方、容積負荷を一定にしてSRTを変えた場合にも、MLSSは変化するが、この場合、MLSSの増加に従ってF/M比は減少することになる。このような、基質投与量およびSRTの変化、または、それに伴うMLSSの変化により、汚泥内リン分布にどのような差異が生じるかを調べた結果を図-5、図-6に示す。分析した汚泥は、A汚泥(表-1)をもとにして、

所定の培養条件で少くともSRTの3倍以上培養した汚泥である。

図-5, 6を見ると, まず, 汚泥内T-Pは, MLSSの増加, すなわち, 負荷またはSRTの増加に伴って増える傾向にあるが(SRT無限大のものを除く), 各画分中のリンには, MLSSの増加とともに増えるものと減るものがある。MLSSとともに増えるのは, ポリリン酸, DNA(単位汚泥量あたり, 以下同)である。ポリリン酸は汚泥内T-Pと類似した傾向を示し, MLSS 3300 mg/ℓ程度まではMLSSとともに増加するが, SRT無限大(汚泥のひきぬきなし)の場合のみMLSSの増加(8600 mg/ℓ)にもかかわらずリン量は減少した。F/M比が極端に小さい状態では, ポリリン酸は減少するようである。また, 一般に, 単位生物量あたりのDNAは, 極端な栄養のアンバランスなどがない限り, ほぼ一定とされているが, 図-5, 6では, MLSSが2000 mg/ℓ付近までは, DNAがMLSSに比例して増えており, MLSSが2000 mg/ℓを越えている場合のみ, DNAはMLSSによらず一定となっている。MLSSの低い状態で, 汚泥内DNA量がMLSSの影響を受けるのはたいへん興味深い, その理由については不明である。

一方, MLSSの増加に伴って減少するのは, Protein Fr., C-PCA Fr. などであった。RNAについては, 差で値を求

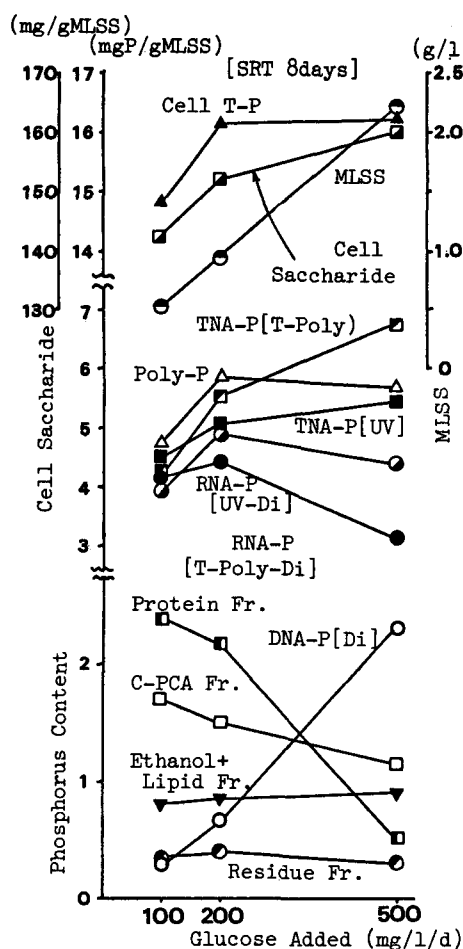


図-5. 基質投与量によるリン分布の変化

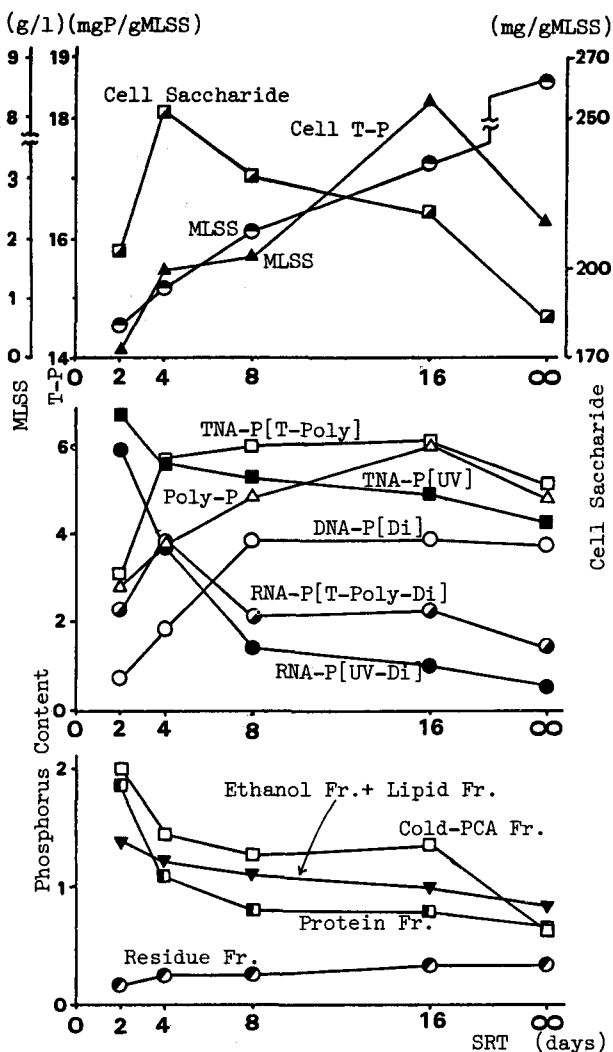


図-6. SRTによるリン分布の変化

めているため、分析値の信頼性に若干の問題はあるが、SRTを変化させた場合には、MLSSの増加（F/M比の減少）に伴って値が減少した。基質投与量を変えた場合には、有意な変化がみられなかった。

以上から考えると、汚泥内リン分布は、F/M比（またはSRT）や容積負荷そのものよりも、それらによって決まるMLSSによる影響を受けており、MLSSすなわち汚泥密度が、汚泥内リン分布、ひいてはリンにかかわる汚泥特性を決める1つの重要な因子になっているように思われる。

5. まとめ

STS法を用いて測定される汚泥内リン分布の、代謝過程および培養条件による変化を検討した。結果として得られたのは、以下のような点である。

- (i) 汚泥内リン分布に影響する培養条件の因子として、基質の種類、培地リン量、混合特性、DOレベルまたは嫌気過程の有無、などがあげられる。
- (ii) 基質代謝過程での培地リンの増減は、汚泥内リン分布の変化としてとらえられ、とくに核酸とポリリン酸の寄与が大きかった。
- (iii) 培地リンを制限した時の影響は、リン源涸渇→ポリリン酸の減少（1mgP/gMLSS以下）→DNAの減少（0.5mgP/gMLSS）→代謝活性の低下、という経過をたどるようだが、混合培養系では、このような経過が明瞭な形では現われないこともある。
- (iv) 汚泥内リン分布は、培養条件としてのMLSSの影響を受ける。低MLSS（500～2000）において汚泥内DNA量がMLSSに比例すること、著しくF/M比の低い場合を除き、各画分のリン量はF/M比や容積負荷よりもそれによって決まるMLSSに相関していること、などがその例である。

6. おわりに

本研究は、筆者らがこれまで行なってきたSTS法を用いた実験的研究のうち、基礎的な部分についてまとめたものである。汚泥内リン分布の変化を見ることにより、培地リンの増減や培養条件による汚泥特性の差異を説明できることがわかったので、今後は、実処理場でのリンの挙動や、生物的脱リンプロセスで生じる現象の解析などに応用してゆきたいと考える。

〔参考文献〕

- (1) 水野 「核酸の一般的分離定量法」 学会出版センター（1979）
- (2) 味埜，松尾 「活性汚泥内のリン分布に関する研究—STS法を用いた汚泥内リン分析」 第35回年講（1980）
- (3) S. N. Hong, K. S. Kisenbaner, R. W. Fernandez, "Design and Operation of a Full-scale Biological Phosphorus Removal System" Proc. of 52th W. P. C. F. Conference（1979）