

(1) 嫌気性流動床内生物膜の形成過程における微生物集積効果

ENRICHMENT OF MICROBIAL POPULATIONS IN THE PROCESS OF BIOFILM FORMATION IN ANAEROBIC FLUIDIZED BED REACTOR

荒木 信夫*・原田 秀樹**・桃井 清至**

Nobuo ARAKI*, Hideki HARADA**, Kiyoshi MOMONOI**

ABSTRACT; The changes in biofilm physical properties and microbial activities with respect to acid production, acetate production, methane productions from H_2 and from acetate, were investigated during initial biofilm formation in anaerobic fluidized bed reactor, at four different upflow velocities, i.e., 4, 7, 14 and 25 $m \cdot hr^{-1}$. An initial biofilm formation due to the direct adhesion of inoculum sludge onto the carrier surface occurred significantly within 1 to 2 days in runs at 14 and 25 $m \cdot hr^{-1}$ and the biofilm thickness developed up to 200 μm . Succeedingly to the initial adhesion, the biofilm thickness decreased eventually to 100 μm with time, while the biofilm density increased gradually to 120 and 60 $mg \cdot cm^{-3}$, for respective runs. For a run at 4 $m \cdot hr^{-1}$, the whole bed was occupied by granulated sludge, having a size ranging 1 to 5 mm and containing several carriers. The microbial activities for all four items increased rapidly to 5 to 30 times those of inoculum sludge in all runs. When the larger upflow velocity was imposed, the more quickly those activities attained at the respective saturation values. The biofilm activities, excluding in the item of acid production, rose up to 5 to 7 times as large as those sludge grown in a suspended system.

KEYWORDS; Anaerobic treatment, Microbial activity, Biofilm formation, Fluidized bed reactor

1. はじめに

嫌気性固定床法、嫌気性流動床法等の付着増殖型プロセスの最大の特徴は、増殖速度の小さい嫌気性微生物を反応器内に高濃度に保持することである。これらのプロセスは、すでに一部の有機性産業廃水の高速メタン発酵処理に適用されており、良好な処理成績を示している。嫌気性生物処理法は、好気性生物処理法に比較してプロセスへの入力エネルギーが極めて小さい、余剰汚泥の生成が少ないといった特長を有していることから、一層の適用範囲の拡大が図られるべきである。

好気性微生物による有機物の分解は単一の細胞内で炭酸ガスにまで分解が行われる。一方、嫌気性微生物による有機物の分解反応は、栄養形態の異なる四種の菌群、すなわち酸生成菌、水素生成酢酸化菌、水素酸化性メタン菌と酢酸酸化性メタン菌がその分解経路を分担することによって遂行される¹⁾。これら嫌気性菌群は、栄養物の連係だけでなく、酸化還元電位や水素分圧といった生育環境を保障しようといった

* 長岡工業高等専門学校土木工学科 (Dept. of Civil Engr., Nagaoka National College of Technology)

** 長岡技術科学大学工学部建設系 (Dept. of Civil Engr., Nagaoka University of Technology)

密接な共生関係にある。嫌気性付着増殖型プロセスでは、単に反応器内に高濃度に生物を保持するだけでなく、これらの四種の菌群の共生関係が維持されていることが必要不可欠である。また、逆の見方をすれば、生物密度の高い生物膜が馴養されたならば、環境の急激な変化によって受ける影響が小さいといった特長も有している²⁾。本プロセスのスタートアップでは、生物膜の形成が最大の課題であり、その後のプロセスの処理能力を決定するものとなる。嫌気性付着増殖型プロセスを安定した処理技術として確立するには、生物膜形成メカニズムを解明し、生物の高濃度培養技術を開発する必要がある。

嫌気性生物膜は、酢酸酸化性メタン菌である *Methanothrix* 属の菌が集積することによって形成することが明らかにされている³⁾。Morgan ら⁴⁾は、MPN法を用いて嫌気性生物膜およびグラニュール汚泥内の各種細菌数を計測した。また、Kubaら⁵⁾は、嫌気性流動床内に形成した生物膜を試料として回文実験を行い、基質の濃度変化から生物膜内の活性菌体量を評価する方法を報告している。本研究は、流動床型反応器内の担体表面に付着増殖する嫌気性生物膜に注目し、生物膜が形成する過程における四種の嫌気性菌群の生態系の変化を各菌群固有の比活性から追跡し、同時に生物膜の膜厚、膜密度といった物理的な性状の変化と比較することにより、各菌群が生物膜形成に果たす役割、生物膜内への微生物の集積、および流動床型反応器の重要な操作パラメーターである上昇線流速が生物膜の形成に及ぼす影響について検討したものである。

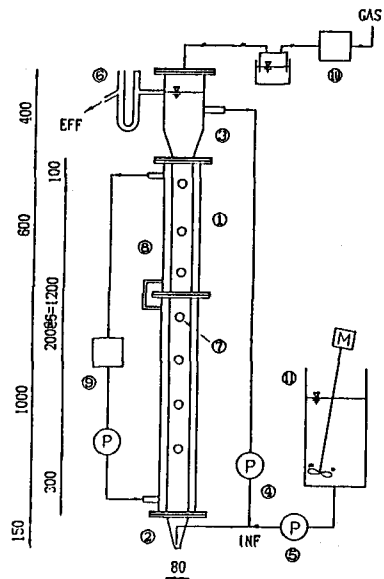
2. 実験装置と方法

2. 1 実験装置

実験は、水理学的滞留時間を30日に設定した2ℓ容のケモスタット型反応器(7リットル・ファーマー MBF-250、攪拌回転数200rpm)と上昇線流速を四条件に設定した13ℓ容の流動床型反応器を用いて行った。Fig. 1は、流動床型反応器の概要を示したものである。反応器は、内径8cm、高さ160cmの塩ビ性カラムで、下部の流体整流器と上部の分離槽より構成されている。カラムには、底部より30cmの高さから20cm間隔に七つのサンプリング口を設けた。基質の供給は定量チューブポンプにより循環ラインから注入し、処理水は分離槽に設置したインバーテッドサイホンを通して流出するようにした。反応器内の温度は、ウォータージャケットにより30℃に制御した。反応器は四系列用意し、循環ポンプにより上昇線流速を $4\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $7\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $14\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $25\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ に設定し、それぞれを Run-1、2、3、4とした。付着担体は、クレハビーズ活性炭を標準フルイで調整し、脱イオン水で洗浄、脱気して用いた。この活性炭の平均粒径は0.48mmであり、真比重は $1.696\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ である。また、静置充填時で反応器内充填高さが40cmとなるように担体投入量を設定した。清水による設定上昇線流速での流動床の膨張率は、充填時を100%とすると、それぞれ105%(Run-1)、110%(Run-2)、130%(Run-3)、195%(Run-4)である。

2. 2 実験条件と方法

流動床型反応器のスタートアップは、種汚泥として都市下水処理場中温消化汚泥 ($15600\text{mg-VSS}\cdot\text{l}^{-1}$)を投



1: FLUIDIZED BED REACTOR 2: DISTRIBUTOR
3: SEPARATOR 4: RECYCLE PUMP 5: FEED PUMP
6: INVERTED SIPHON 7: SAMPLING PORT 8: WATER JACKET 9: CONSTANT TEMP. APPARATUS 10: WET TEST GASMETER 11: SUBSTRATE RESERVOIR

Fig. 1 Schematics of the fluidized bed reactor.

入し、Table 1に示したショ糖+スキムミルクを主成分とする人工基質(Composition A+B)を用いて運転を開始した。この人工基質の有機物濃度は、 $2000\text{mg-COD}\cdot\text{l}^{-1}$ である。ケモスタット型反応器は、流動床と同じ種汚泥を投入し、流動床で用いた基質の10倍濃度基質($20000\text{mg-COD}\cdot\text{l}^{-1}$)をHRTが30日となるように間欠的に注入した。種汚泥の植種時の濃度は、流動床では $2540\text{mg-VSS}\cdot\text{l}^{-1}$ 、ケモスタットでは $1920\text{mg-VSS}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。一方、流動床型反応器のスタート時の有機物負荷は $0.5\text{g-COD}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ であるが、反応器の処理状況を観察しながら段階的に上昇させた。流動床が反応器上部まで展開し、生物膜付着担体が分離槽に堆積した場合は、流動床の上昇流速を一時的に低下させて分離槽に堆積した生物膜付着担体を最上部のサンプリング口より余剰汚泥として引き抜き、未付着担体を追加投入した。

3. 分析方法

各実験系における各菌群の比活性は、ケモスタット内浮遊汚泥および流動床内生物膜担体を一試料につき四本の窒素ガスを充填した120mlバイアル瓶にサンプリング口より瞬時に採取し、 O_2 フリー窒素ガスをを用いて十分に置換後、24~36時間程度 35°C ウォーターバス内で振盪し、持ち込み基質のメタン化を行った。その後、Table 1に示した糖(Composition B+F+G)、混合有機酸(C+F+G)、水素(D+F+G)、酢酸(E+F+G)を主なエネルギー源として調整した各基質を $1000\text{mg-COD}\cdot\text{l}^{-1}$ となるように添加(水素ガスはバイアル内の気相部を置換)し、経時的に基質消費量またはメタン生成量を測定することによって嫌気性菌群を構成する代表的な酸生成菌、酢酸化菌、水素酸化性メタン菌、酢酸酸化性メタン菌のそれぞれの比活性を評価した。

流動床内の担体に付着した生物膜厚は、生物膜付着担体と超音波によってその生物膜を剥離した担体の実体顕微鏡写真を撮影し、担体 200個以上の測定値の各平均粒径の差から求めた。また、生物膜担体の平均粒径は、長径と短径を実測し、その径を持つ回転楕円体の体積と同じ体積を持つ球の粒径とした⁶⁾。流動床内MLVSSは、試料中の生物膜を超音波(ブラッソ250)によって担体から剥離し、担体と生物膜汚泥を分離して測定した。生物膜密度と生物膜付着量は、MLVSS 測定試料中の剥離乾燥生物膜重量とこの試料中の剥離担体の乾燥重量(105°C)から得られた担体総表面積と総表面積に生物膜厚を乗じて求めた生物膜容積から算出した。

細胞外多糖(ECP)含有率は、浮遊汚泥および超音波剥離生物膜を水蒸気抽出(104°C 、20min)し、その遠心分離(4°C 、20min、8000rpm)上澄液の還元糖濃度(フェノール硫酸法)を測定し、被抽出汚泥重量当たりの抽出糖量として評価した。

4. 実験結果と考察

4. 1 運転状況

Fig. 2は、Run-1~4の容積負荷と溶解性 COD_{sol} (以後CODと略す)除去率の経日変化である。それぞれの Runは、COD除去率が 80%以上の値を維持するように負荷上昇を行い、除去率が低下した場合は負荷を一時的に低下させて運転を行った。これにより、流入有機物は良好にメタンにまで分解され、酸生成菌、酢酸化菌、水素酸化性メタン菌と酢酸酸化性メタン菌の四種の菌群の共生関係が生物膜内で良好に維持されたことになる。Run-1、2では、段階的な負荷上昇を行っても急激なメタン転換効率の低下はなく、運転開始40~50日で $5\text{g-COD}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ の負荷に達した。Run-3では、負荷は $5\text{g-COD}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ に達したものの、この負荷が限界で

Table 1 Substrate compositions for the fluidized bed reactor experiment and for the activity tests.

Composition: A	mg/l	Composition: E	mg/l
SUCROSE	1200	$\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1900
SKIMMED MILK	700	YEAST EXTRACT	75
NH_4Cl	172		
K_2HPO_4	36	Composition: F	mg/l
NaHCO_3	1500	NH_4Cl	100
		K_2HPO_4	1450
Composition: B	mg/l	KH_2PO_4	750
GLUCOSE	1000	$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$	200
YEAST EXTRACT	75		
		Composition: G	mg/l
Composition: C	mg/l	$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	33.3
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COONa}$	400	$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15.0
YEAST EXTRACT	75	FeCl_2	5.0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{COOH}$	2.5 ml/l	$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5.0
(10% Sol.)		$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36.8
Composition: D	%	$\text{Na}_2\text{SO}_3\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	107.0
H_2 Gas	80	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.2
CO_2 Gas	20	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
For Continuous Feeding: A + G			
For Activity Tests			
Glucose: B + F + G		Mixed Acids: C + F + G	
Hydrogen: D + F + G		Acetate: E + F + G	

あり、余剰汚泥を引き抜いた直後は除去率が80%以下に低下した。また、Run-4の最大負荷は、 $3\text{g-COD}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ であった。これは、上昇線流速が大きい条件では僅かな生物膜の付着によっても容易に担体が分離槽まで上昇するために、流動床容積当たりの MLVSSが増大しなかったことが原因である。反応器からの流出 VSSは、いずれのRunも運転開始7日程は種汚泥の流出によって高い濃度であったが、その後は実験期間を通じて大きな変化はなく、Run- 1,2では $50\sim 100\text{mg-VSS}\cdot\text{l}^{-1}$ 、Run-3,4では、 $120\sim 180\text{mg-VSS}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。

HRTを 30日に設定して運転を行ったケモスタットは、実験期間を通じて良好なメタン生成が行われており、COD除去率は90%以上であった。槽内の汚泥濃度は、当初 $1920\text{mg-VSS}\cdot\text{l}^{-1}$ であったが、運転の継続に従って $2500\text{mg-VSS}\cdot\text{l}^{-1}$ まで徐々に上昇し、運転30日以後に安定した。

4. 2 流動床型反応器内の生物膜形成

Fig.3 は、流動床展開高さの経日変化を示したものである。Run- 3,4では、生物フロックの初期吸着現象が発生する⁸⁾ ことにより、流動床は運転開始2～4日目には反応器最上部の分離槽まで展開した。この初期吸着は、反応器内に上昇流を与えると投入した種汚泥が微細なフロックを形成し、そのフロックが担体表面の一部に吸着する形態をとるものであった。この吸着したフロックは、運転を継続するにつれて担体全体を被覆するように増殖し、生物膜化した。一方、Run-1,2では、初期吸着現象は発生せず、流動床は負荷の増大に伴

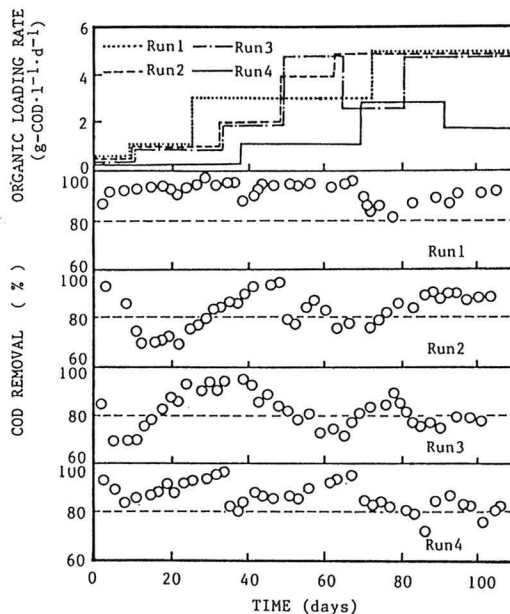


Fig.2 Time course of COD removals and loading rates for Run-1 to Run-4.

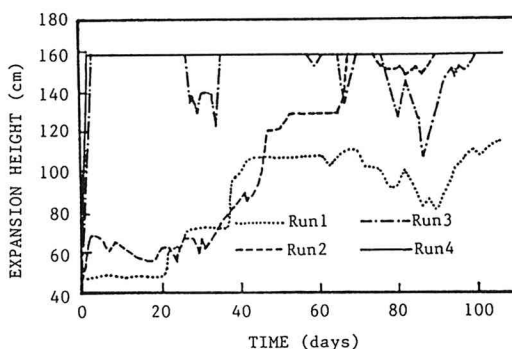


Fig.3 Changes in the fluidized bed height with cultivation time.

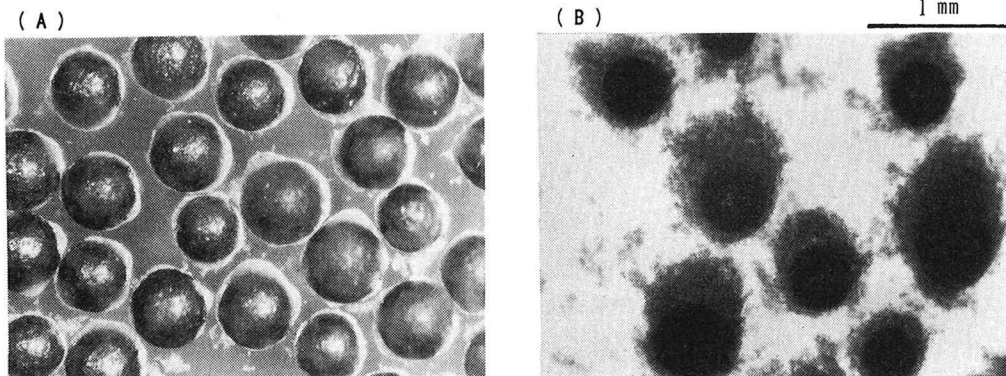


Photo 1 Photographs of the biofilm at 7th day after start-up. (A) Run-2; (B) Run-3.

って徐々に展開した。Run-1の流動床は、 $5\text{g-COD}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ の負荷では反応器上部までベッドが展開することなく、Run-2では、流動床が最上部まで展開するのに約70日の運転を要した。Run-1,2において生物膜の形成が阻害された原因は、上昇線流速が小さいために流動床の空隙率が小さく、担体同士が激しく接触することによって吸着フロックが担体表面から剥離し、単に膜が肥厚できなかつたためである。Photo 1は、Run-2とRun-3の運転開始7日目に採取した生物膜の実体顕微鏡写真である。初期吸着の発生したRun-3では、担体の一部に密度の小さいフロックが辛うじて付着している様子が観察される。また、担体同士の摩擦が大きかったRun-2の生物膜は、表面の各所に薄い膜が付着しているに過ぎない。

Fig. 4は、Run-2,3,4における生物膜厚、膜密度と担体単位表面積あたりの生物付着量の経日変化を示したものである。 $4\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ の低線流速条件(Run-1)では、反応器内の汚泥は担体表面に均一の層の生物膜を形成せず、担体を数個取り込んだ粒径1~5mmのグラニュールが混在したベッドを形成した。Run-3,4で観察された初期吸着生物膜の膜厚はほぼ $200\mu\text{m}$ であるが、その後 $100\mu\text{m}$ 程度にまで徐々に低下した。逆に、膜密度は生物膜の形成に伴って増大する傾向を示した。この膜厚の減少は、担体同士の衝突や生成ガスの上昇によって生物膜表面に物理的な剪断力が作用したことにより、また、膜密度の上昇は、生物膜内に拡散した基質によって生物膜内部で微生物が増殖したことによるものと考えられる。Run-3では、初期吸着時の膜密度は $2\text{mg-VSS}\cdot\text{cm}^{-3}$ であったが、膜厚の減少に伴って $12\text{mg-VSS}\cdot\text{cm}^{-3}$ と6倍にまで上昇した。一方、Run-2の生物膜は、密度は徐々に増加するものの、膜厚は運転開始60日程度まで $50\mu\text{m}$ と一定値を示した。容積負荷が $5\text{g-COD}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ に達すると生物膜厚は徐々に増大し、流動床も展開を開始した。また、小さな容積負荷でしか運転を行えなかつたRun-4では他の反応器に比較して膜密度の増加は小さい。担体表面の生物膜付着量は、生物膜厚と膜密度によって変化するが、グラフの傾きから判断して膜密度に強く依存して変化した。負荷が $5\text{g-COD}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ に達するまでの期間のグラフの傾きから本実験系での生物膜の成長速度を算出すると、Run-3では $2.9\mu\text{g-VSS}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ 、Run-2では $1.0\mu\text{g-VSS}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ であった。

Fig. 5は、流動床MLVSSと細胞外多糖含有率の経日変化を示したものである。Run-3,4での流動床MLVSSは、実験期間を通じてそれぞれ $3200\text{mg-VSS}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $2000\text{mg-VSS}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。

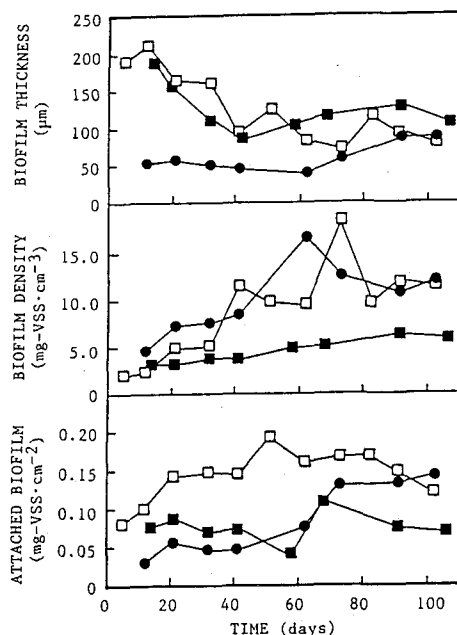


Fig. 4 Changes in the biofilm properties, in terms of biofilm thickness, biofilm density and attached biomass per unit surface area. ●, Run-2; □, Run-3; ■, Run-4.

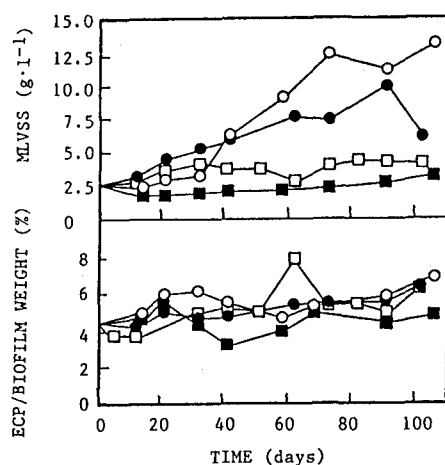


Fig. 5 Changes in MLVSS equivalent (corresponding to reactor volume) and the extracellular polysaccharide (ECP) content of the biofilm. ○, Run-1; ●, Run-2; □, Run-3; ■, Run-4.

VSS・ l^{-1} 程度の値を示している。上昇線流速の小さい Run-2においても MLVSSは最大 10000mg-VSS・ l^{-1} であり、流動床型反応器としては極めて小さな値であった。これは、付着担体に用いた粒状活性炭のみかけ比重が $1.48g\cdot cm^{-3}$ と小さく、わずかな生物膜の付着によっても容易に流動床が展開したためである。グラニュールベッドを形成したRun-1のMLVSSは、運転開始106日に13000mg-VSS・ l^{-1} に達した。生物膜の形成に関与するとされている細胞外多糖 (Extracellular polysaccharide)⁸⁾の嫌気性生物膜中の含有率は、いずれの Runも種汚泥の含有率である4.3%から著しい変化はなく、生物膜の形成につれてわずかに上昇傾向を示した。これまでに本実験系における反応器軸方向の生物膜の細胞外多糖含有率は、低部から上部へと増加することを報告したが⁹⁾、生物膜形成期間の上昇線流速の変化に対しては明かな傾向が認められなかった。細胞外ポリマーは蛋白質成分も含有していることから、今後は細胞外蛋白質についても定量して検討する必要があるだろう。

4. 3 生物膜形成過程における菌群比活性の変化

各菌群の最大比活性の値は、酸生成菌が $77g\text{-COD}\cdot g\text{-VSS}^{-1}\cdot d^{-1}$ 、酢酸資化性メタン菌が $2.49g\text{-COD}\cdot g\text{-VSS}^{-1}\cdot d^{-1}$ と報告されている^{11, 13)}ように数十倍の違いがある。今、高分子の有機物を完全にメタンにまで分解している系、すなわち、四種の菌群が系内に培養されている条件において、各菌群の比活性をこれまでに報告されている各菌群の最大比活性を基準として、相対活性度(Relative Activity Index)で表示することにする。各菌群の持つ比活性が連続実験期間および嫌気条件の維持によって比活性試験時には変化しないものと仮定すると、相対活性度の上昇は、生物膜中に菌群が集積していることを示すものとなる。すなわち、生物膜の各菌群の比活性の変化を相対活性度で表示することにより、生物膜内の嫌気性菌群の生態系の変化を観察することができる。相対活性度は以下の式で示される。

相対活性度(%)

$$= \frac{\text{生物膜中の各菌群の比活性}(g\text{-COD}\cdot g\text{-Biofilm}^{-1}\cdot d^{-1})}{\text{各菌群の最大比活性}(g\text{-COD}\cdot g\text{-Biomass}^{-1}\cdot d^{-1})} \times 100$$

Fig. 6は、Table 2に示した各菌群の最大比活性を用いてRun-1~4における相対活性度の変化を示したものである。各菌群の相対活性度は、生物膜の形成によって上昇しており、種汚泥として用いた消化汚泥に換わってショ糖+ミルク基質を分解する嫌気性菌群が集積していることが分る。特に、いずれの系においても相対活性度が大きく変化するのは酸生成菌と酢酸資化性メタン菌であり、生物膜の形成にこの二種の菌群が大きく関与しているものと判断できる。上昇線流速の大きい条件では初期吸着が発生し、相対活性

Table 2 Maximum specific activities of anaerobic microorganisms from references.

Microbe	Max. Specific Activity	Substrate	Reference
Acid Producing Bacteria	77	Glucose	10
Acetogenic Bacteria	7.1 7.9	Propionate Butyrate	11
Hydrogentrophic Methanogen	25	CO ₂ /H ₂	12
Acetoclastic Methanogen	2.49	Acetate	13

Activity: g-COD·g-VSS⁻¹·d⁻¹

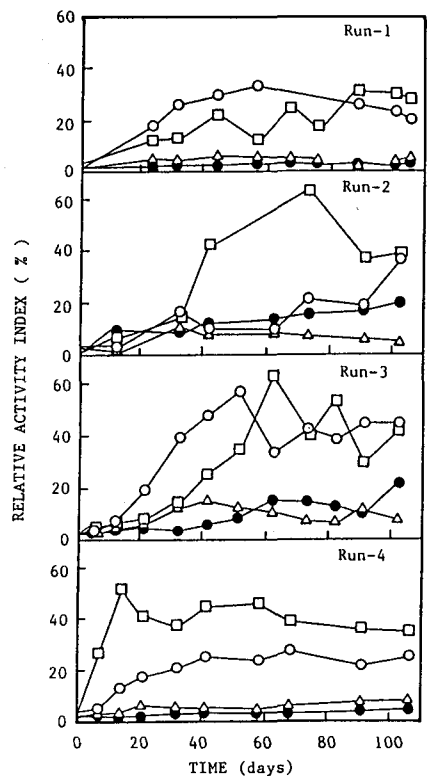


Fig. 6 Changes in RAI (Relative Activity Index) of the individual microbial population present in the biofilm. □, acid prod. bacteria; △, acetotogenic bacteria; ●, hydrogentrophic methanogen; ○, acetoclastic methanogen.

度の上昇(生物膜への菌の集積)と各菌群の相対活性度の安定(生物膜中の菌相の安定)が速い。これは線流速の変化によって生物膜汚泥の SRTが異なることが大きく影響しているものと考えられるが、操作パラメーターである上昇線流速によって生物膜の質的、量的制御が可能であることを示唆するものである。Run-1 の汚泥は、生物膜というよりもUASB反応器内のグラニュール汚泥のような形態を示したが、大きい線流速条件に比較すると汚泥中の各菌群の相対活性度は小さい。これは、SRTが大きいために種汚泥中の不活性成分が残留したものと考えられる。最も安定した流動状態であった Run-3の生物膜と低線流速条件で安定したグラニュールベッドを形成した Run-1の汚泥では、増殖速度の極めて小さい酢酸資化性メタン菌の生物膜への集積が最も速く発生した。一方、担体同士の摩擦によって初期吸着の阻害された Run-2と大きい線流速によって噴流が生じ安定した流動条件が得られなかった Run-4では、生物膜の形成期には酸生成菌の集積が顕著であった。

Fig. 7は、Run- 2~4で形成した生物膜の酢酸資化性メタン菌の比活性と生物膜付着量の関係である。酢酸資化性メタン菌は、四種の菌群中生物膜付着量と最も密接な関係があり、酢酸資化性メタン菌の比活性が上昇すると担体表面の生物膜付着量も増加する。Methanothrix属菌の集積は、嫌気性生物膜の質的改善をもたらすものであるが、それと同時に、生物膜の物理的性質を決定する要因であることが明らかである。密度上昇の小さかった Run-4と容積負荷が $5\text{g-COD}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ に達するまで生物膜の肥厚が発生しなかったRun-2の生物膜は、ずれもMethanothrix属菌の集積が小さかったことが原因と考えられる。また、これは生物膜へのMethanothrix属菌の集積が有機物負荷と密接な関係にあることを示している。

4. 4 生物膜への各菌群の集積度

比活性試験により嫌気性生物膜は、基質を分解する菌群が集積することによって形成するものであり、その形成期間には生物膜を構成する菌相が変化するものであった。そこで、流動床の持つ菌群の選択効果、すなわち生物膜への菌群の集積効果をより明確化するために、流動床内の生物膜と基質条件を同じに設定し完全浮遊状態で培養した汚泥の各菌群の比活性と比較した。ここで、ケモスタット汚泥と生物膜中の各菌群の相対活性度の比を集積効果(Enrichment Index)とすることにした。Fig. 8 は、HRTを30日に設定して運転を行ったケモスタット内汚泥の各菌群の相対活性度の変化である。相対活性度が種汚泥から大きく上昇したものは生物膜と同様に酸生成菌と酢酸資化性メタン菌であるが、運転26日以降は上昇せず、それぞれの菌群が一定値を示した。流動

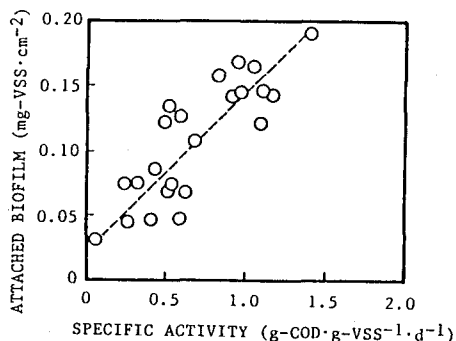


Fig. 7 Relationship between the methane producing activity derived from acetate and the attached biofilm mass.

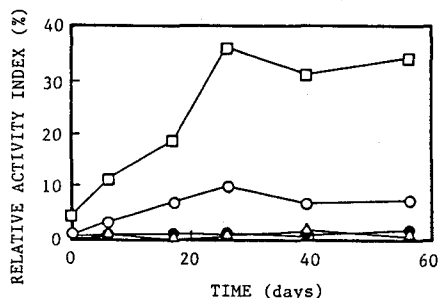


Fig. 8 Changes in RAI (Relative Activity Index) of the individual microbial population developed in the chemostat reactor. □, acid prod. bacteria; △, acetogenic bacteria; ●, hydrogentrophic methanogen; ○, acetoclastic methanogen.

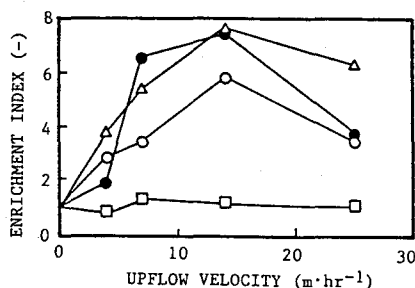


Fig. 9 Effect of upflow velocity on EI (Enrichment Index) of the individual microbial population. □, acid producing bacteria; △, acetogenic bacteria; ●, hydrogentrophic methanogen; ○, acetoclastic methanogen.

床反応器内のSRTは、反応器内汚泥量と流出+余剰 VSS量から概算できるが、本反応器では、それぞれ 32 days(Run-1)、16.4 days(Run-2)、13.3 days(Run-3)、8.2 days(Run-4)であった。また、反応器内汚泥量は流動床MLVSSと流動床容積から算出した。Fig. 9は、生物膜への各菌群の集積効果と上昇線流速の関係である。集積効果は、ケモスタットでは30日以降に得られた各菌群の相対活性度の平均値、生物膜ではそれぞれ運転80日以降の測定値の平均値から算出した。流動床は、SRT、HRT共にケモスタットに比べて同等かそれより小さい条件であるが、酸生成菌を除く三種の菌群の集積効果は、Run- 1、2、3と順に大きくなる傾向を示している。Run-3では、集積効果は 5~7にまで上昇した。これは、嫌気性生物膜の形成が単に微生物の高濃度保持を達成するだけでなく、酢酸資化性メタン菌と同様に増殖速度の小さいAcetogenic菌とこの菌に必要な低い水素分圧を保障する水素利用メタン菌も集積していたことから、より理想的な生態学的共生関係が構築されたことを示している。一方、比活性の大きい酸生成菌の集積効果は、いかなる線流速条件においても 1程度であり、生物膜の形成によって集積することはなかった。この現象は、酸生成菌の生物膜への集積が他の菌群の棲 (habitat)を奪うことになり生物膜のメタン生成比活性を低下させる原因となることから、もう一つの嫌気性生物膜の特長とすることができる。Run-4では、他のRunで大きな集積効果を示した三種の菌群の選択効果が小さな値を示しているが、これは、Run-4では最大 $3\text{g-COD}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ と小さな負荷でしか運転を行わなかったことが原因と考えられる。

4. 5 上昇線流速の操作パラメーターとしての有効性

これまでの実験結果から、流動床内の上昇線流速は嫌気性生物膜の形成過程に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。生物膜の形成過程は、吸着期、形成期、安定期の三つに区分することができる。すなわち、生物膜は、種汚泥フロックが担体表面に吸着する吸着期、生物フロックが担体表面全体を覆い酸生成菌や他の菌群が集積する形成期と酢酸資化性メタン菌の集積によって生物膜が安定した生物凝集体に成長する安定期を経て形成される。嫌気性生物膜を馴養する際に操作パラメーターである上昇線流速の有効性を上げると以下のとおりである。吸着期および形成期には、ある程度大きな線流速で運転することにより、①担体への初期吸着現象を促進し、また、②過剰な種汚泥フロックの付着を抑制することによって、小 SRT条件下で嫌気性菌群の集積を加速することができる。また、安定期には、線流速を減少させることにより、③流動床の生物濃度を増加させ、高負荷運転を行うことによって、④酢酸資化性メタン菌の集積を加速し、安定した生物膜に成長させることができる。また、これらの操作は嫌気性流動床反応器だけでなく、上昇線流速を操作パラメーターとする嫌気性膨張床や固定床反応器のスタートアップ期間にも有効な手法と考えられる。

5. まとめ

粒状活性炭を付着担体とし、上昇線流速を $4\sim 25\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ の四条件に設定した嫌気性流動床型反応器のスタートアップ実験を行い、担体表面に付着増殖する生物膜の形成過程において、嫌気性菌群を代表する四種の菌群の比活性の変化と膜厚、膜密度といった生物膜の物理的性質の変化を追跡した結果、以下の知見が得られた。

- 1) スタートアップ初期の生物膜形成速度は、運転開始当初に種汚泥フロックの担体表面への初期吸着現象が発生すると大きい。この初期吸着現象は、上昇線流速の小さい条件よりも、流動床空隙率が大きい比較的高い線流速条件で発生した。
- 2) 初期吸着の発生した生物膜は、密度は $2\text{mg-VSS}\cdot\text{cm}^{-3}$ であるものの、膜厚は $200\mu\text{m}$ と大きいものであるが、運転を継続すると膜厚は徐々に減少し、密度は増加する傾向を示した。また、担体表面積あたりの生物膜付着量は、膜厚よりも膜密度に依存して変化した。
- 3) 嫌気性生物膜の形成によって比活性が大きく変化する嫌気性菌群は、酸生成菌と酢酸資化性メタン菌であり、生物膜の比活性はそれぞれ種汚泥に比べて10~30倍に増大した。担体同士の過剰な衝突や

流動床内に噴流が発生する場合は、まず生物膜内に酸生成菌の集積が起こり、反応器内が安定した流動状態にある場合は酢酸資化性メタン菌の集積が先行した。また、生物膜の酢酸資化性メタン菌の比活性と担体表面の生物膜付着量は密接な関係にあった。

4) 生物膜のAcetogenic菌、水素資化性メタン菌と酢酸資化性メタン菌の比活性は、浮遊状態で培養した汚泥の5~7倍の値であった。また、酸生成菌の比活性は、生物膜と浮遊汚泥に差が無かった。

5) 流動床内の上昇線流速は、大きいほうが種汚泥に換わって嫌気性菌群の生物膜への集積が速く、また、生物膜内の菌相の安定に要する期間も短かった。

おわりに、本研究の実験の面で多大なご協力を得た、当時長岡工業高等専門学校土木工学科学学生珠坪一晃、岩渕和有、大橋英俊、小熊浩、星敬徳、野沢立也各氏に感謝致します。また、本研究の一部は文部省科学研究費(奨励研究A)の補助を受けて行ったものであり、記して謝意を表します。

[参考文献]

- 1) Gujer, W. and Zehnder, A. J. B.; Conversion processes in anaerobic digestion, Water Science and Technology, 15, Copenhagen, pp.127-167, 1983.
- 2) Barnes, D., Bliss, P. J., Grauer, B. and Robins, K.; Pretreatment of high strength wastewater by an anaerobic fluidized bed process. Part 2 response to organic load transients, Environmental Technology Letters, 6, pp. 73-78, 1984.
- 3) Harvey, M., Forsberg, C. W., Beveridge, T. J., Pos, J. and Ogilvie, J. R.; Methanogenic activity and structural characteristics of the microbial biofilm on a needle-punched polyester support, Applied and Environmental Microbiology, 48, pp. 633-638, 1984.
- 4) Morgan, J. W., Evison, L. M. and Forster, C. F.; Changes to the microbial ecology in anaerobic digesters treating ice cream wastewater during start-up, Water research, 25, pp. 639-653, 1991.
- 5) Kuba, T., Furumai, H. and Kusuda, T.; A kinetic study on methanogenesis by attached biomass in a fluidized bed, Water research, 24, pp. 1365-1372, 1990.
- 6) Shieh, W. K., Sutton, P. M. and Kos, P.; Predicting reactor biomass concentration in a fluidized bed system, Journal of Water Pollution Control Federation, 53, pp. 1574-1584, 1981.
- 7) 柴崎和夫、小林茂、足利伸行、西島衛: 嫌気性流動床における造粒物形成のメカニズム、水質汚濁学会講演集, 25, pp. 538-539, 1991.
- 8) Christensen, B. E., Characklis W. G.; Physical and chemical properties of biofilms, in Biofilms, ed. W. G. Characklis and K. C. Marshall, New York: Wiley, pp. 93-130, 1990.
- 9) 荒木信夫、原田秀樹、桃井清至: 嫌気性流動床反応器軸方向の生物膜の特性、衛生工学研究討論会講演集, 27, pp. 55-57, 1991.
- 10) Zoetemeijer, R. J., Arnoldy, P., Cohen, A. and Boelhouwer, C.; Influence of temperature on the anaerobic acidification of glucose in a mixed culture forming part of a two-stage digestion process, Water research, 16, pp. 313-321, 1982.
- 11) Lawrence, A. W. and McCarty, P. C.; Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment, Journal of Water Pollution Control Federation, 42, pp. 1-17, 1969.
- 12) Shea, T. G., Pretorius, W. A., Cole, R. D. and Peason, E. A.; Kinetics of hydrogen assimilation in the methane fermentation, Water research, 2, pp. 833-843, 1968.
- 13) Huser, B. A., Wufmann, K. and Zehnder, A. J. B.; Methanotrix soehngenii gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium, Archives of Microbiology, 132, pp. 1-9, 1982.