

(2) 嫌気性流動床における剥離速度と付着生物活性に関する研究

Detachment Rate and Specific Activity of Attached Biomass in a Methanogenic Fluidized Bed

今井 剛*・古米弘明**・楠田哲也*

Tsuyoshi IMAI*, Hiroaki FURUMAI**, Tetsuya KUSUDA*

ABSTRACT; The objectives of this study are to evaluate the distribution of specific activity within attached biofilm in a fluidized bed and to investigate the detachment of each "active" biomass from the biofilm. A fluidized bed was operated in a steady state as a methanogenic reactor with supply of a synthetic wastewater, a mixture of acetate, propionate, and butyrate. Batch experiments were conducted to measure the specific activities of biomass in effluent, stepwise sloughed biomass, and attached biomass in bed. The results indicated that the biomass in the surface layer of biofilm had much higher activity than that inside the layer. The highest activity was obtained for biomass in effluent. The distributions of the activities illustrated that more "active" biomass existed in the biofilm surface where more frequent detachment of biomass occurred.

The trend of the activity distribution was explained by a newly developed model considering accumulation of inert biomass and biomass detachment from biofilm surface. A first order rate constant of detachment for each "active" biomass was roughly estimated at 0.013, 0.022, and 0.055 [day^{-1}] for acetate, propionate, and butyrate decomposing biomasses, respectively. The estimated values were much larger than literature values based on whole biomass. The model predicts that bacteria with higher growth rates are able to exist predominantly in the surface layer against high biomass detachment and that the decay biomass mainly accumulates inside the biofilm.

KEYWORDS; Anaerobic treatment, Methanogenic fluidized bed, Biofilm detachment model, Biomass activity distribution.

1. はじめに

嫌気性処理プロセスは、従来より低濃度廃水の大量処理を行う必要のある一般廃水処理には適用されず、下水汚泥や食品加工工場からの産業廃水に代表される高濃度有機性廃水の処理という特殊な場合に適用されてきた。しかし、嫌気性ろ床、嫌気性流動床等の高濃度に生物保持が可能なプロセスが開発され、加えて省エネルギーの重要性が提唱されるようになったので、中濃度域の有機性廃水やさらには下水への応用も検討されてきている¹⁾²⁾。

著者らは、嫌気性流動床内の付着生物膜に関する化学組成分析、電子顕微鏡観察および動力学モデルによる解析を通じて、不活性な部分が生物膜内に相当量存在することや、VSSのような生物量指標を基準に求めた基質消費速度では菌体増殖に伴う非定常な解析を行うことには限界があることを報告してきた³⁾⁴⁾。したがって、系内に高濃度に微生物を付着保持させるプロセス、言い換えればSRTの長い生物膜処理プロセスにおいて、不活性有機固形物を含めた付着生物組成を考慮した生物膜の動力学特性を把握することは重要であると考えられる。

嫌気性流動床においては、生物膜表層部から付着生物は連続的に剥離していると考えられ、生物膜深部から剥離する速度とは大きく異なる可能性がある。つまり、生物膜表層部においては剥離速度が大きいため増殖速度の大きい活性のある菌体が多く存在し、内部においては活性のある菌体とともに死滅菌体や細胞外ポリマーに代表される不活性固形有機物の蓄積も生じるものと予想される。

そこで、本研究では混合酸基質(酢酸、プロピオン酸、n-酪酸)で長期間にわたり運転を行い、定常状態に

* 九州大学工学部水工土木学科 (Department of Civil Engineering Hydraulics, Kyushu University)

** 茨城大学工学部都市システム工学科 (Department of Urban and Civil Engineering, Ibaraki University)

達している嫌気性流動床の担体付着生物膜を対象にして、担体から段階的に剥離した生物膜の活性、流出バイオマスの活性および担体に付着した状態での生物膜の活性をそれぞれ測定した。そして、定常状態における動力学的モデルの解析を通して各基質分解菌の剥離係数の推定を行い、その剥離係数値の違いと生物膜内の基質消費比活性の分布の関連づけから、生物膜の動力学特性に関して検討を行うことを目的とした。

2. 実験方法

本研究で用いた2基の嫌気性流動床⁹⁾(No.1, No.2)は有効高さ80[cm]、内径約4.5[cm]のWater-Jacket付アクリル樹脂製反応槽である。反応槽は、温度コントローラーにより 35 ± 1 [°C]に保持され、循環ポンプにより上昇流を与えて担体付着菌体を流動状態に維持した。担体には粒径 $0.299 \sim 0.344$ [mm]の合成ゼオライト(真比重2.27、内部空隙率13.8%)を用いた。酢酸(HAc)、プロピオン酸(HPr)、n-酪酸(n-HBu)の混合酸(HAc : HPr : n-HBu = 2 : 1 : 1)を基質として、負荷 $4.0[\text{kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}]$ で長期間連続運転を行い、定常状態に達した担体付着菌体の基質消費活性を調べるために、2.1 ~ 2.3に述べる3種類の実験を行った。ただし、No.1およびNo.2の基質流入条件は、それぞれ流入濃度が $4000[\text{mg-COD/l}]$ および $1000[\text{mg-COD/l}]$ 、水理学的滞留時間(HRT)が $1.0[\text{day}]$ および $0.25[\text{day}]$ である。

2.1 担体付着生物膜の活性測定実験

生物膜は活性菌体と不活性有機固形物により構成されており、その比率により全有機固形物(例えば、VSS)当りの比活性が左右されるものと考えられる。そこで担体に菌体が付着した状態での付着全有機固形物の基質消費活性を調べる実験(初期濃度が $500[\text{mg-COD/l}]$)を流動床本体(No.1, No.2)を用いて行った。また、同時に担体付着VSS量の測定を行った。なお、ゼオライト担体自体に強熱減量があるため、Appendixに示す分析および計算手順で付着VSS量の算定を行った。

回分実験における測定項目は、揮発性脂肪酸(VFA)濃度、pH、ガス生成量、ガス組成、タンパク質濃度およびSS、VSS濃度である。また、VFAはFIDガスクロマトグラフ法によって、またガス組成はTCDクロマトグラフ法によって分析した。以下2.2および2.3で述べる実験でも同様な測定を行った。

2.2 流出バイオマスの活性測定実験

流出バイオマス中の活性菌体量は、付着生物膜からの剥離量と浮遊状態での活性菌体の増殖量との和および系外への流出量のバランスにより決定されている。1日以下というHRT条件では、流出する活性菌体量に比べ、浮遊状態の活性菌体の増殖量は無視できる程度となり、浮遊活性菌体量は付着生物膜からの剥離量とバランスする。よって、浮遊状態で存在する活性菌体のほとんどは付着生物膜からの剥離量に由来する。また、死滅菌などを含めたバイオマス全体についても同様に、付着生物膜からの剥離量と流出量が釣り合っており、流出バイオマスは生物膜からの剥離バイオマスに由来している。したがって、流出バイオマスの活性を調べることで、付着生物膜からの剥離生物膜の特性や剥離状況を検討することが可能と思われる。

そこで、流動床(No.1)からの流出液(床内循環液)を用いて、その基質消費活性を測定するバイアル回分実験を行った。温度 35 [°C]、振とう数 100 [回/min]に設定した恒温振とう槽内で、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸の各濃縮基質溶液($10000[\text{mg-COD/l}]$)を初期濃度が $1500[\text{mg-COD/l}]$ になるように添加して、単一基質での基質消費回分実験を行った。なお、添加した濃縮基質はCOD成分を除き嫌気性流動床に投入した組成⁹⁾と同一である。また、バイアル実験および嫌気条件の確保のために、手順は久場ら⁹⁾の手法に準じた。

しかし、採取した循環液のVSS濃度は、流動床の担体付着生物膜から剥離させた懸濁液に比べ、数十[mg/l]程度と非常に低く、基質消費カーブを得るために要する時間が長くなることが予想された。したがって、実験時間短縮のため以下の手順で汚泥の濃縮を行った。

①窒素ガスで置換し、ブチルゴム栓およびアルミニウムキャップで密栓したバイアルビン(内容積約 35 [ml])

内に流動床の床内循環液を分取する。

②遠心分離(2100×g, 5分)を行い、その上澄み液のみを抜き取り濃縮する。

③新たな循環液をバイアルビン内に再度注入し、②、③の操作を繰り返すことにより汚泥濃度を高める。

2.3 剥離生物膜の活性測定実験

流動床(No.2)の担体付着生物膜を3段階に剥離させ(全付着生物量に対するおおよその割合は20%, 5%, 5%)、それぞれについて基質消費速度を回分実験で測定することにより、実験的に生物膜表面とその内部における比活性の違いを調べた。また、流動床(No.1)の担体付着生物膜の約25%を一度に剥離させたものについても比活性を求めた。

まず、窒素ガスで水上置換したバイアルビン(内容積約70[ml])に、嫌気性流動床内の担体から3段階に、あるいは1度に剥離させた付着生物膜の懸濁液をそれぞれ分取し、その剥離懸濁液のVSS濃度を希釈調整したものを3本準備した。この希釈調整には、流動床の床内循環液を嫌気条件で遠心分離(2100×g, 5分)して得られる上澄液を用いた。そして、2.2と同様なバイアル回分実験を、初期基質濃度500[mg-COD/l]で行った。なお、剥離懸濁液の採取手順は、以下の通りである(Fig.1 参照)。

- ①基質が残存していない流動床の循環液をバイアルビン(内容積約150ml)に一杯に満たし、流動床からシリンジを用いて採取した担体付着菌体を、空気に触れないように窒素ガスを吹き付けながら液中に沈降させる。
- ②スパーテルの搅拌により担体から菌を剥離させ高濃度剥離懸濁液を得る。ただし、この操作を行う間もバイアルビンの口には窒素ガスを充分吹き付ける。
- ③高濃度剥離懸濁液のみをシリンジにより採取する。
- ④段階的に剥離を行う場合には、再び、流動床の循環液を②のバイアルビンに満たし、②～③の操作を2回繰り返す。

上記の方法では必ずしも生物膜表面から順々に剥離しているとは限らないものの、剥離しやすいものから懸濁液として回収されていると考えられる。

3. 結果と考察

3.1 活性菌体量の推定結果

3種類の活性測定実験結果のうち、流出バイオマスと流動床本体を用いた場合の基質消費カーブをFig.2 (a)、(b)に示した。流出バイオマスを用いた実験では、初期菌体濃度が十分に高くなかったため、流動床本体での実験とは異なり基質濃度は初期から直線的には減少してい

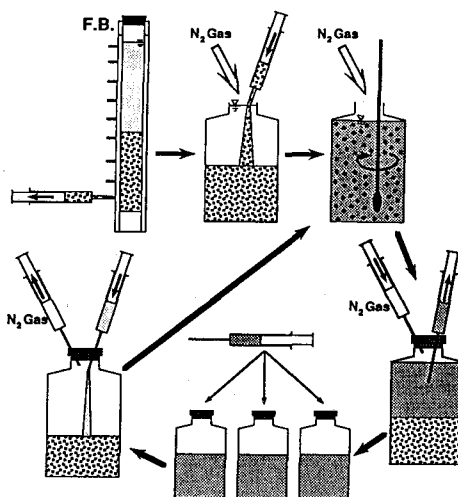


Fig.1 Sampling method of the attached biomass on media

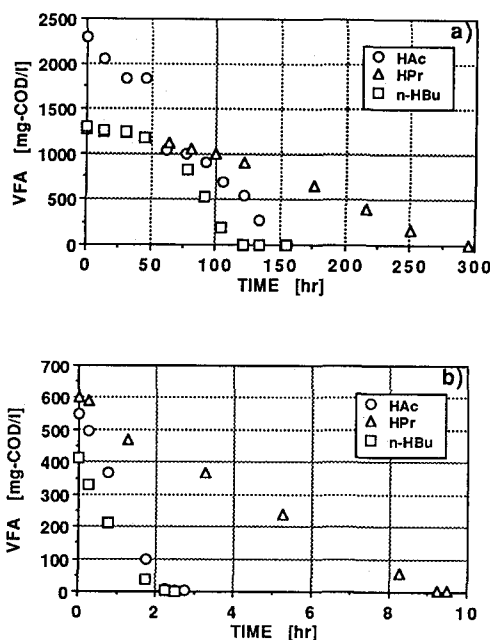


Fig.2 Consumption of each VFA in batch experiment
a) Effluent biomass
b) Attached biomass

ない。剥離生物膜を用いた実験でも、その傾向が見られた。したがって、基質濃度の減少直線の傾きから基質消費速度を求められない実験については、活性菌体量推定の基礎式⁹⁾を参考にして、最大比増殖速度(μ_m)と増殖収率(Y)を与えて基質濃度変化のカーブフィッティングを行い、初期菌体量(X_a)を推定した。また、流動床本体での実験では基質消費速度を直線の傾きから求め、それを μ_m とYを用いて X_a に換算し直した。使用した動力学定数については、本流動床内付着微生物について、Kuba et al.⁹⁾が求めたHAc利用メタン菌、HPrおよびHBu分解菌の μ_m (それぞれ0.26, 0.19, 0.60 [day⁻¹])を与え、Yは0.05 [mg-COD_{cell}:mg-COD⁻¹]¹⁰⁾とした。

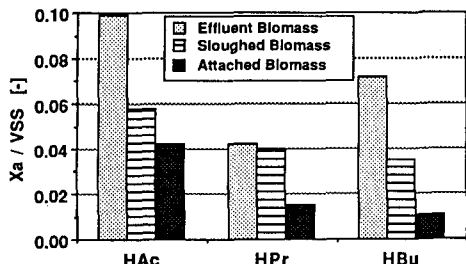
推定された初期菌体量を実測VSSで割ることにより無次元化し、付着菌体の比活性の指標とした。その結果をTable. 1に示す。なお、ここで示したAttached biomass濃度の算定に際し、測定した付着生物膜量(VSS)、生物膜付着担体の沈降体積および担体(ゼオライト)質量から求められる担体表面積を用いて平均膜厚を推定したところ、およそ200~250[μ m]程度となった。ただし、生物膜の占める体積を求めるために必要となる担体沈降時の空隙率は、生物膜付着担体が球形であると仮定して0.4を用いた。流動床本体を用いた実験結果から得られる全付着VSSに占める割合は、HAc利用菌が4.1~4.2%と一番多く、HPr分解菌が1.5%、HBu分解菌が1.1~1.8%であり、三者の合計でも7%程度である。水素利用メタン菌を加えても担体付着VSS中の活性菌体の割合は10%程度と予想され、残りの90%以上が不活性有機固形物で占められていることになる。

流出バイオマスについては、全付着生物当りの比活性に比べ、かなり高い値を示している。その両者の中間に剥離した生物膜の活性が位置する傾向があることが分かる。一方、段階的に剥離させた場合では、剥離回数に依存して比活性が変化していること、また剥離の順を追って活性が低下しており、最終の3回目に剥

Table.1 Specific activity of substrate consumption by biomass in fluidized bed (F.B.)

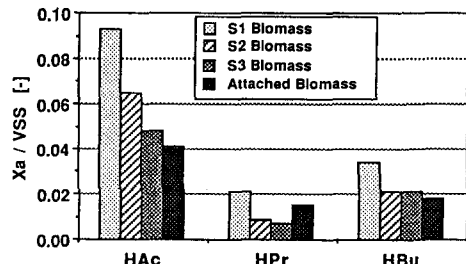
F.B	Sample Name	Substrate	X_a [mg-COD/l]	VSS [mg-COD/l]	X_a / VSS [—]
No.1	Attached biomass	HAc	1754	41344	0.042
		HPr	632		0.015
		n-HBu	440		0.011
No.2	Attached biomass	HAc	1362	33065	0.041
		HPr	505		0.015
		n-HBu	600		0.018
No.1	Sloughed biomass	HAc	726	10320	0.058
		HPr	664	13520	0.040
		n-HBu	240	5560	0.035
No.2	1 st. Sloughed biomass (S1)	HAc	96	1035	0.093
		HPr	13	605	0.021
		n-HBu	21	611	0.034
	2 nd. Sloughed biomass (S2)	HAc	59	912	0.065
		HPr	4	495	0.009
		n-HBu	11	526	0.021
	3 rd. Sloughed biomass (S3)	HAc	34	711	0.048
		HPr	5	749	0.007
		n-HBu	10	453	0.021
No.1	Effluent biomass	HAc	25	253	0.099
		HPr	11	264	0.042
		n-HBu	18	249	0.072

VSS : Values are expressed in terms of COD using COD/VSS ratio of 1.22.
 X_a : Values are estimated based on the kinetic method.



X_a : Values are estimated based on the kinetic method.

Fig.3 Specific activity of effluent, sloughed and attached biomass (F.B. No.1)



X_a : Values are estimated based on the kinetic method.

Fig.4 Specific activity of sloughed and attached biomass (F.B. No.2)

離されたものが全付着生物当りの比活性と近い値を示していることがわかる。

次に、流動床ごとに活性菌体の存在割合をグラフに表したのがFig. 3 およびFig. 4 である。Fig. 3 は、推定された活性菌体の存在割合が流出バイオマス、剥離生物膜、全付着生物膜の順に小さいことを端的に表している。また、3 段階に剥離した生物膜および付着生物膜の推定活性菌体の比率の比較を示すFig. 4 でも、剥離された順に活性が低下することをよく表している。これは、剥離が頻繁に起こっていると思われる生物膜表層に、活性菌体がより多く存在していると考えることによって説明できる。つまり、流出バイオマスは生物膜表層部から活性菌体を多く含む生物膜の剥離分により構成され、最も高い比活性を有する。一方で、生物膜内部において不活性有機物が多く存在すると考えられる。しかし、流出バイオマスの比活性は他に比べ高いものの、VSS成分の大部分は不活性有機固形物で占められていることには変わりなく、生物膜表層部にも相当量の不活性有機固形物が存在していることが予想される。

流出バイオマスや段階的に剥離した生物膜(S 1 ~ S 3)の基質分解菌の存在比率を比較すると、HAc利用菌、次いでHBu分解菌、HPr分解菌の順である。HAc利用菌の比率が高いことは、その流入濃度が高く、しかもHPrやHBuの分解からも供給されることで説明ができる。また、HAc利用菌は他の分解菌とは異なり、第2回剥離生物膜の活性も比較的高いままである。この点も、利用可能な基質量が他の菌に比べ多いためと解釈できる。

その流入濃度が同じで、菌体量推定において仮定した増殖収率が同じであるHBu分解菌とHPr分解菌の比率の違いは、生物膜表層部における空間的な競合関係を示しているものと思われる。すなわち、HBu分解菌の最大比増殖速度は、HPr分解菌のそれに比べて大きく、剥離速度の高い表層部で増殖するには有利と思われる。その結果、増殖速度を大きく保ち得る微生物群が優先的にその存在割合を占めるものであることが推測される。一方、全付着生物膜中のHBu分解菌、HPr分解菌の存在比率は、さほど差がないことを考え合わせると、増殖速度が遅くなりがちな微生物群は内部での増殖を余儀なくされるが、剥離から守られた形で存在するとも考えられる。このことは、微生物にのみ適用される概念ではなく、死滅係数という“比増殖速度”を有する不活性有機固形物にあてはまるものと思われる。したがって、生物膜内での活性菌体や死滅菌体の存在できる場所は、比増殖速度や死滅係数の大小に依存していると考えられる。また、同時に剥離速度も生物膜内の増殖・蓄積過程を支配する重要な要因と考えられる。

そこで、次節以降ではこの実験結果をもとに、不活性有機固形物の蓄積モデル^{7,11)}を用いて各菌体ごとの剥離係数の推定を行い、また、単純化した生物膜の剥離モデルを展開し、定常状態での付着生物膜内の活性分布についてさらに検討を行う。

3.2 各基質分解菌別の剥離係数の推定

筆者らは嫌気性流動床における付着生物膜内不活性有機固形物の蓄積モデルを提案している¹¹⁾。このモデルにおいて対象とする嫌気性流動床では、付着比表面積が大きいことため生物膜厚が比較的薄くなり、流動を維持するために線流速が大きく液膜厚さも十分に薄いと考えられる。また、本投入基質を分解する嫌気性菌群は、好気性従属栄養菌と比較して比基質消費速度が遅い。これらのことから、液本体と生物膜内濃度の差が無視できる完全浸透を仮定した⁹⁾。また、循環の条件から液本体は均一濃度状態と仮定でき、菌体の増殖速度を表現するために液本体の基質濃度を用いることによる誤差はさほど大きくならないと考えられる。完全浸透を含め、生物膜の増殖や剥離などについて以下のような仮定を設けている。

- 1) 流動床循環液と生物膜内における基質濃度の差が無視できる完全浸透である。
- 2) 菌体増殖はMonod式で表現できる。
- 3) 付着微生物と浮遊微生物の両者を考慮する。
- 4) 細胞外ポリマーは活性菌体が生成し、その量は活性菌体の増殖量に比例する。
- 5) 剥離速度は各有機固形物量に比例する。

付着生物膜の処理プロセスを検討する上で非常に重要であるにも関わらず、バイオポリマーの生成と生物膜の剥離に関しては、詳細なモデルを構築するのに十分な実験的検証や知見がまだ得られていない。そこで、このモデルでは第一段階の近似としての仮定を設定している。

まずバイオポリマーの生成については、微生物の代謝産物の生成速度は増殖に関係するものと維持代謝に関係するものとに分けられる

ことが知られている¹²⁾。しか

しながら、嫌気性微生物の維持代謝や自己分解によるバイオポリマー生成についての知見が見あたらないことから、ここでは増殖に関係するバイオポリマー生成のみを考慮している。

次に剥離については、剥離速度を付着生物量の一次式¹³⁾で表現する方法を採用している。この一次式による表現は、他の流動床型処理プロセスの研究^{14,15)}でも用いられているが、付着生物膜全体に対する総括的な値として剥離係数が一律に与えている。しかし本モデルにおいては、生物膜内の各活性菌体と不活性有機固形物とを区別して剥離係数を別個に考慮しており、それが特色となっている。したがって、ここで定義される剥離係数は様々な要素を含む総括的な係数ではあるが、これを用いて各付着バイオマス成分の剥離のしやすさを評価することができる。

このモデルにおいて、浮遊

と付着活性菌体の動力学定数が一定であるとみなした場合の定常解を求めた(参照、Table. 2)。Table. 2の(8), (12)式に示されるように、付着バイオマス(VSS_b)と同様に流出バイオマス(VSS_s)の活性菌体の割合も剥離係数に依存している。そこで、この活性菌体の剥離係数を変化させ、流出バイオマス中の各基質分解菌の存在比率を計算した。ただし、剥離係数は4種類の菌群に対し一律に与えた。計算に用いたその他のパラメータはTable. 3に示す通りである。投入基質濃度およびHRTは本流動床運転時の値を与え、生物膜の主成分である死滅菌体および細胞外ポリマーの剥離係数は、流動床の定常期における流出VSSと担体付着VSSの比を概略値として用いた。

Fig. 5に示すように、各菌体の存在比率の測定値と計算値の交点を読み取ることにより、それぞれの剥

Table.2 Steady-state solutions of the model considering accumulation of inert organic solids

Specific growth rate		
Attached biomass		
$M_{bl} = \frac{\mu_{mbi} \cdot S_i}{K_{sbi} + S_i}$	$i = A(HAc), P(HPr), B(HBu), H(H_2)$	... (1)
Suspended biomass		
$M_{si} = \frac{\mu_{msi} \cdot S_i}{K_{ssi} + S_i}$	$i = A, P, B, H$	... (2)
Substrate production rate		
$R_{pA} = \sum_i \gamma_i \cdot \left(\frac{1}{Y_{bi}} \cdot (1 - Y_{bi}) \cdot M_{bi} \cdot X_{bi} + \frac{1}{Y_{si}} \cdot (1 - Y_{si}) \cdot M_{si} \cdot X_{si} \right)$	$i = P, B$	... (3.1)
$R_{pP} = 0, \quad R_{pB} = 0$		... (3.2)
$R_{pH} = \sum_i (1 - \gamma_i) \cdot \left(\frac{1}{Y_{bi}} \cdot (1 - Y_{bi}) \cdot M_{bi} \cdot X_{bi} + \frac{1}{Y_{si}} \cdot (1 - Y_{si}) \cdot M_{si} \cdot X_{si} \right)$	$i = P, B$	... (3.3)
Substrate		
$S_i = \frac{K_{si} \cdot (K_{di} + K_{ai})}{\mu_{mbi} \cdot (K_{di} + K_{ai})}$	$i = A, P, B, H$	... (4)
Attached biomass		
$X_{bi} = \frac{\left(\frac{Q(S_i^0 - S_i)}{V} + R_{pi} \right) \cdot Y_i}{K_{di} + K_{ai}}$	$i = A, P, B, H$	... (5)
$X_{bi} = \frac{\sum_i (K_{di} \cdot X_{bi})}{K_{ai}} = \sum_i \frac{K_{di} \cdot \left(\frac{Q(S_i^0 - S_i)}{V} + R_{pi} \right) \cdot Y_i}{K_{ai} \cdot (K_{di} + K_{ai})}$	$i = A, P, B, H$	... (6)
$P_b = \frac{\sum_i \alpha_i \cdot (K_{di} + K_{ai}) \cdot X_{bi}}{K_{ap}} = \sum_i \frac{\alpha_i \cdot \left(\frac{Q(S_i^0 - S_i)}{V} + R_{pi} \right) \cdot Y_i}{K_{ap}}$	$i = A, P, B, H$	... (7)
$VSS_b = \sum_i (X_{bi}) + X_{bi} + P_b$	$i = A, P, B, H$	... (8)
Suspended biomass		
$X_{si} = \frac{K_{ai} \cdot X_{bi}}{\frac{Q}{V} - K_{ai}}$	$i = A, P, B, H$	... (9)
$X_{si} = \frac{V}{Q} \cdot \sum_i K_{di} \cdot (X_{bi} + X_{si})$	$i = A, P, B, H$	... (10)
$P_s = \frac{V}{Q} \cdot \sum_i \alpha_i \cdot (K_{di} + K_{ai}) \cdot (X_{bi} + X_{si})$	$i = A, P, B, H$	... (11)
$VSS_s = \sum_i (X_{si}) + X_{si} + P_s$	$i = A, P, B, H$	... (12)

離係数を推定した。推定値は、HAc利用菌で0.013、HPr分解菌で0.022、HBu分解菌で0.055[day⁻¹]であった。推定値は菌群により数倍の違いを有しており、計算上で仮定した一律の剥離係数の条件が満足されていないことになる。したがって、これらの値はそれぞれの

菌体の剥離係数を厳密には意味していない。しかしながら、以下の理由により剥離のしやすさおよび概略の値を反映しているものと考えられる。

Table. 2の(9)～(11)式で示されるように、浮遊活性菌体量が付着菌体量に比べ十分に少ない場合には、各浮遊有機固形物量は剥離係数の大小で変化する付着活性菌体量に比例する形で表現できる。すなわち、流出バイオマス全体量(VSS_g)はおおよそ各活性菌体量の和に比例している。この付着活性菌体量はTable. 2の(5)式に示すように、剥離係数のみでなく死滅係数との和に依存して変動する。したがって、剥離係数が死滅係数に比べ低い領域では、付着活性菌体量は剥離係数にあまり依存せず、その結果流出VSS_gもさほど変化しないことになり、上記の値は剥離しやすさの程度を各活性菌体ごとに表しているものと思われる。高い剥離係数を持つと予想されるHBu分解菌については誤差が大きいが、VSS_gに占めるHBu分解菌に關与したバイオマスは約1/5程度であり、基質COD消費量の最も大きいHAc消費菌に關与したバイオマスが主体を占めている。このことを考え合わせると、一律の剥離係数の条件における推定値のうち、HAc消費菌およびHPr分解菌については、誤差はさほど大きくないものと考えられる。

水素利用メタン菌については実験を行っていないので直接剥離係数を推定することはできないが、HPr分解菌およびHBu分解菌との共生関係が考えられているので、これらの分解菌に近い剥離しやすさを有するものと推測される。

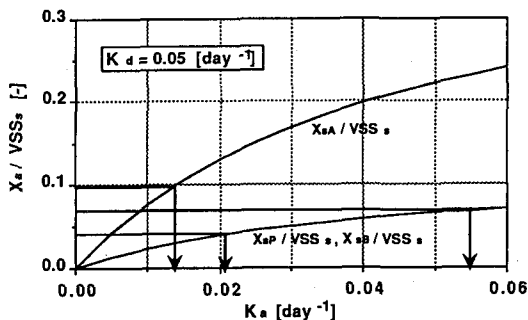
以上のことより、剥離のしやすさの程度を比較すると、HAc利用菌が一番小さく、次いでHPr分解菌、HBu分解菌の順に大きくなっている。すなわちHAc利用菌は生物膜内部にも存在していること、生物膜表面では増殖速度の大きいものが優先的にその存在割合を占めるという可能性が、この推定結果からも伺える。また概略の推定値は、実験での実測VSS基準で求めた剥離係数(0.001[day⁻¹])および流動床での剥離係数の文献値^{14, 15)}に比べて1オーダー高いことを示しており、活性菌体と不活性有機固形物の剥離のしやすさが大きく異なることが実験的に確認された。

3.3 生物膜の剥離モデルと付着生物膜比活性の検討

好気性生物膜については、2種類以上の微生物種を考慮した非定常モデルの研究^{16, 17)}が進められてきている。生物膜厚や微生物の最大比消費速度などの因子に左右されるが、一般に好気性生物膜ではその内部に基質濃度分布を生じ、それに応じて生物膜内に微生物種の分布が形成されることが指摘されている。実験的にSS基準で回転円板の付着生物の有機物酸化比活性度を調べている例¹⁸⁾では、表層部で中層部や底層部より14～23%高い値が報告されている。しかし、嫌気性流動床では膜厚が薄く、嫌気性菌の比消費速度が比較的低

Table.3 Values of kinetic parameters

Substrate	S ⁰ [mg-COD/l]	HRT [day]	μ _m [day ⁻¹]	K _s [mg-COD/l]	Y [-]	K _a [day ⁻¹]	K _d [day ⁻¹]	α [-]	K _{al} [day ⁻¹]	K _{aP} [day ⁻¹]
HAc	2000	1.0	0.26	20	0.05	0.00 ~ 0.06	0.05	0.3	0.001	0.001
HPr	1000		0.19	20						
n-HBu	1000		0.60	90						
Hydrogen	0		1.2	0.0016						



X_a: Values are estimated based on the kinetic method.

Fig.5 Estimation of detachment rate constant for each "active" biomass

いため完全浸透が仮定できると考えられる。よって、生物膜内で基質濃度が一定で、比増殖速度が変わらないとみなせる生物膜において、その表層部側に比活性が高い領域が形成される理由を検討する必要がある。

生物膜の成長や剥離過程は複雑で、定量的な検討を行うための知見は不十分であるが、Fig. 6 に示すような生物膜の剥離モデルを考えた。その基本的な概念は、生物膜表層部に剥離速度が大きい領域が存在し、内部ほど剥離速度は低いと考える。剥離はある一定の厚さを有する形で起こり、外側で剥離が起こった領域においてはさらにその内部の剥離が起こり得ると仮定する。この考えに従えば、外側に剥離速度が大きい領域が、そして内側は剥離から守られている領域が存在することを表現できる。また、ここで剥離定数は各層が剥がれる確率に相当するものと捉えられる。

そこで、生物膜を深さ方向について n 層に仮想的に分割し、それぞれについて活性菌体濃度、死滅菌体濃度、剥離係数、膜厚、動力学定数を Fig. 6 に示すように定義する。ただし、完全浸透を仮定しているので比増殖速度は一定で与える。なお、剥離係数は剥離速度が生物量に比例すると考えた定数である。ここでは単純化のために、2 層で 1 種類の微生物の場合を考える。Table.

4 の (1), (2) 式は各層での全付着 VSS 濃度が一定であることを意味し、(3)~(5) 式は、定常状態での物質収支である。活性菌体の収支式から判断して、定常状態では第 1 層(表層)での剥離量が実質の増殖量を上回り、第 2 層(底層)で過剰に増殖する量がそれを補うことで定常な生物膜が保持されていることが分かる。両層の活性菌体量の比は(3-2)式のように表わされる。また、基質濃度の関数である比増殖速度(μ)は(6)式で表現できる。(6)式は全増殖量と剥離量に関連して決まる μ に対し、表層の底層に対する厚さの

比が十分に小さくなれば、表層の活性菌体濃度は底層より高くなり、比活性が大きくなることを表している。

したがって、流動床において付着生物膜の表層に剥離速度の大きく薄い領域が存在し、また内部にはその剥離から守られた領域で死滅菌体の蓄積が起こっていると考えることで、3.1 で示したように付着生物膜の表層部が内部に比べ基質消費比活性が高い結果を概念的にも説明できる。

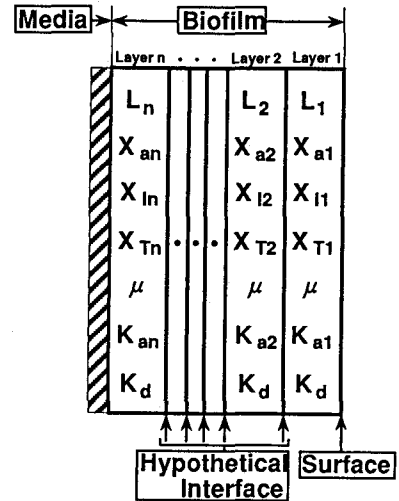


Fig.6 Conceptual model for biomass detachment in fluidized bed

Table.4 Steady-state solutions of the model for biomass detachment

$X_{T1} = X_{a1} + X_{i1}$	...	(1)
$X_{T2} = X_{a2} + X_{i2}$	...	(2)
$(\mu - K_{a1} - K_d) \cdot X_{a1} \cdot V_1 + (\mu - K_{a2} - K_d) \cdot X_{a2} \cdot V_2 = 0$	...	(3.1)
$(K_d \cdot X_{a1} - K_{a1} \cdot X_{T1}) \cdot V_1 + (K_d \cdot X_{a2} - K_{a2} \cdot X_{T2}) \cdot V_2 = 0$	...	(4)
$Q \cdot (S^0 - S) - \frac{\mu}{Y} \cdot (X_{a1} \cdot V_1 + X_{a2} \cdot V_2) = 0$	...	(5)
$\frac{X_{a1}}{X_{a2}} = \frac{V_2}{V_1} \cdot \frac{\mu - K_{a2} - K_d}{K_{a1} + K_d - \mu}$	...	(3.2)
$\mu = \frac{\mu_m \cdot (Q \cdot S^0 \cdot Y - K_{a1} \cdot X_{T1} \cdot V_1 - K_{a2} \cdot X_{T2} \cdot V_2)}{Q \cdot S^0 \cdot Y + Q \cdot K_s \cdot Y - K_{a1} \cdot X_{T1} \cdot V_1 - K_{a2} \cdot X_{T2} \cdot V_2}$	...	(6)
where, $V = L \cdot A$		
X_a : Active biomass concentration, μ : Specific growth rate,		
X_i : Inert biomass concentration, L : Thickness of Layer,		
X_T : Total biomass concentration, A : Surface area of biofilm,		
V : Volume of Layer		
Subscript 1: Layer 1, 2: Layer 2		

3.4 嫌気性流動床における生物膜制御に対する剥離係数の重要性

付着増殖型プロセスの生物量制御の問題は、浮遊型増殖プロセスにくらべ研究が少なく、SRTが長いがゆえに軽視される傾向があるように思われる。しかし、上記のように処理を担う菌体の剥離係数が死滅係数と同程度値である流動床型プロセスでは、その重要性は大きいものと考えられる。幸い、流動床型プロセスは付着増殖型プロセスの中では生物量制御を比較的容易に実施可能なプロセスである。しかしながら、従来の

ように生物量指標として実測のVSSを用いて流動床の生物膜制御を行うと菌体のSRTを過大評価することになり、処理水質予測に誤りを生じる可能性があることが指摘できる。

したがって、処理を担う菌体あるいは対象とする生物群の真の剥離係数をもとにそのSRTを考慮する生物膜管理が重要と考えられる。流動床における剥離現象は、流体の剪断応力のほかに粒子同士の衝突など複雑なものである。また、剥離量に直接関係している生物膜表面積は、生物膜厚の増大に伴い変化するが、その変化が無視できない状況も想定できる。上述の生物量に比例すると定義した剥離速度の表現方法も不十分とも考えられる。今後、生物膜制御という観点からも菌体および不活性有機固形物のそれぞれについて剥離現象を定量的に評価する必要があるものと思われる。

4. 結論

本研究では、嫌気性流動床における担体付着生物膜や流出バイオマスの基質消費活性を測定し、付着生物膜内の活性分布状況を実験的に調べた。また、流動床における不活性有機固形物蓄積モデルや新たに構築した剥離モデルを用いた解析を通して、各活性菌体の剥離係数の推定や活性分布を検討した結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 生物膜中のVSS基準の基質消費比活性は表層部において大きく、内部ほど低いことが明らかとなった。したがって活性菌体が表層に、不活性有機固形物が内部に多く存在すると考えられた。また、流出バイオマスの比活性が一番大きいことが実験的に示され、比活性が高い生物膜表層部の剥離速度が高いと推測された。
- 2) 全生物膜における推定活性菌体量の存在比率は全体の10%程度であり、90%以上が不活性有機固形物によって占められている。また、活性の最も高い流出バイオマスでも大部分が、不活性有機固形物である。
- 3) 剥離速度が大きい表層部の存在を考慮した剥離モデルにより、完全浸透条件でも生物膜内に活性分布が形成されることが示された。また増殖速度を大きく保持できる微生物ほど表層部に優先的に存在可能であることが推測された。
- 4) 各基質分解菌の剥離定数は、酢酸利用メタン菌0.013、プロピオン酸分解菌0.022、酪酸分解菌0.055[day⁻¹]程度であると推定された。生物膜内部に大量に存在する不活性有機固形物の剥離定数に比べ、これらの各基質分解菌の剥離係数は1オーダー大きいことが明らかとなった。
- 5) 嫌気性流動床において水質予測や生物膜制御を行う場合には、活性菌体を基礎としたSRTにより制御される必要があり、各基質分解菌および不活性有機固形物の剥離係数の把握が重要であることが示された。

【記号】

K_s : 飽和定数 [mg-COD/l]	K_a : 剥離定数 [day ⁻¹]
K_d : 死滅係数 [day ⁻¹]	M : 比増殖速度 [day ⁻¹]
P : バイオポリマー濃度 [mg-COD _{Poly} /l]	Q : 流量 [l·day ⁻¹]
R_p : 生産速度 [mg-COD·l ⁻¹ ·day ⁻¹]	S : 基質濃度 [mg-COD/l]
V : 反応器容量 [l]	VSS : 固形有機物濃度 [mg-COD/l]
X : 菌体濃度 [mg-COD/l]	Y : 増殖収率 [mg-COD _{cell} ·mg-COD ⁻¹]
α : バイオポリマー生成率 [mg-COD _{Poly} ·mg-COD _{cell} ⁻¹]	μ_m : 最大比増殖速度 [day ⁻¹]
γ : 酢酸への転換係数 [—]	
下付き添字: b (付着), s (浮遊), A (HAc), P (HPr), B (HBu), H (H ₂), I (死滅菌体)	
上付き添字: 0 (流入)	

【Appendix】

担体付着固形有機物の測定法については、以下に示す通りである。

- ①流動床からシリンジを用いて採取した担体付着菌体を目盛付試験管2本(No.1、No.2)にそれぞれ1～2 [ml]分取し、沈降体積(No.1= a [ml]、No.2= b [ml])を測定する。

②No.1試験管の試料については、薬さじのかくはんにより担体から菌体のみを強制的に剥離させ、剥離後の沈降体積(c [ml])を測定する。また剥離懸濁液については液量(d [ml])、タンパク質濃度(e [mg/l])、SS濃度(f [mg/l])およびVSS濃度(g [mg/l])を測定する。残渣については担体付着残留菌体の沈降体積当りのタンパク質濃度(h [mg/l])を測定する。

③No.2試験管の試料については、そのまま担体も含めてSS濃度(i [mg/l])およびVSS濃度(j [mg/l])を測定する。

以上の測定結果を用い、合成ゼオライトの強熱減量率を13.8%、剥離菌体と残留菌体でタンパク質濃度とVSS濃度の比率は等しいと仮定することにより、担体付着固形有機物量は次式で表わされる。

$$VSS = \frac{A \cdot 1000}{b/1000}$$

ここに、

$$A = \frac{j}{1000} - \frac{i-j}{1000} \cdot \frac{R_1}{1-R_1} \cdot \frac{1}{B}, \quad B = \frac{1}{1 - [(1-R_2)R_1] / [(1-R_1)R_2]}, \quad R_1 = 0.138, \quad R_2 = f/g$$

である。

ここで求まるVSSは、担体付着有機固形物の沈降体積当りのものであるから、液相当りに換算して担体付着固形有機物濃度とした。

[参考文献]

- 1) 依田元之、服部美和子、宮地有正、松井三郎 (1986) 嫌気性流動床による下水処理(2)―有機物除去の速度論的解析、下水道協会誌、23、No. 269, 37-43.
- 2) 古米弘明、松本明人、松本順一郎 (1987) 嫌気性膨張床におけるメタン生成に及ぼす流入負荷の影響、下水道協会誌、24、No. 280, 25-34.
- 3) 稲森悠平、松重一夫、岡田光正、砂原広志、須藤隆一(1988) 嫌気性ろ床法の負荷変動下における浄化特性に関する研究、下水道協会誌、25、No.293,69-80.
- 4) 松本明人、野池達也 (1990) 嫌気性流動床におけるメタン生成に及ぼす流入基質濃度および流入負荷の影響、水質汚濁研究、13、54-62.
- 5) Kuba, T., Furumai, H. and Kusuda, T. (1990) A Kinetic Study on Methanogenesis by Attached Biomass in a Fluidized Bed, Water Research, 24, 1365-1372.
- 6) Furumai, H., Kuba, T., Imai, T., and Kusuda, T. (1991) Transient Response of Wastewater Treatment and Biomass Development in a Methanogenic Fluidised Bed, Wat. Sci. Tech., 23, Kyoto, 1327-1336.
- 7) 今井 剛、久場隆広、古米弘明、楠田哲也 (1991) 嫌気性流動床における不活性有機物の蓄積量の評価について、土木学会西部支部研究発表会講演概要集、352-353.
- 8) 久場隆広、古米弘明、楠田哲也(1990) バイアル実験によるメタン生成活性の測定手法に関する検討、水質汚濁研究、13、121-125.
- 9) 古米弘明、久場隆広、楠田哲也 (1990) 嫌気性混合培養系における酢酸利用メタン生成菌の活性菌体量推定法とその応用、衛生工学研究論文集、26、9-18.
- 10) Lawrence, A., W., and P. L. McCarty (1969) Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment, Journal of WPCF, 41, R1-R7.
- 11) 今井 剛、久場隆広、古米弘明、楠田哲也 (1991) 嫌気性流動床における不活性固形有機物の蓄積過程のモデル化について、土木学会第46回年次学術講演会概要集第2部、314-315.
- 12) Characklis, W. G. and Marchall, K. C. (1990) "Biofilm", John Wiley & Sons, Inc.
- 13) Rittmann B. E. (1982) The Effect of Shear Stress on Biofilm Loss Rate, Biotech. & Bioeng., 24, 501-506.
- 14) 申 錫雨、依田元之、渡辺 敦、服部美和子、北川幹夫、宮地有正 (1986) 嫌気性流動床における付着生物膜の動力学的特性、下水道協会誌、23、No.269, 37-43.
- 15) 津野 洋、マクラム・スイダン (1990) 粒状活性炭流動床型嫌気性反応器による石炭ガス化廃水の処理特性のモデル化に関する研究、水質汚濁研究、13、No.8、515-524.
- 16) Kissel, J.C., McCarty, P.L. and Street, R.L. (1984) Numerical Simulation of Mixed-Culture Bifilm, Journal of Environ. Eng. (ASCE), 110, No.2, 393-411.
- 17) Wanner, O. and Gujer W. (1986) A Multispecies Biofilm Model, Biotech. & Bioeng., 28, 314-328.
- 18) Nishidome, K. and Kusuda, T. (1991) Mechanism and Simulation of Biofilm Formation in a Rotating Biological Contactor, Proc. of Int. Sympo. Environmental Biotechnology, April, Ostende (Belgium), 347-351.
- 19) 増田純雄、渡辺義公、石黒正儀 (1987) 回転円板付着生物膜の細菌に関する研究、下水道協会誌、24、No.278, 19-31.