

B-17 活性汚泥による好気条件下での有機物除去過程における一時貯蔵物質

○押木 守^{1*}・小貫 元治²・佐藤 弘泰¹・味埜 俊¹

¹東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系（〒277-8561千葉県柏市柏の葉5-1-5）

²東京大学サステナビリティ学連携研究機構（〒113-8656東京都文京区本郷7-3-1）

* E-mail: oshiki@mw.k.u-tokyo.ac.jp

1. 研究背景

活性汚泥による有機物除去反応は、活性汚泥内の微生物による同化および異化的代謝により担われていると従来考えられてきた。しかし近年、同化・異化的代謝とは別に有機性一時貯蔵物質の蓄積が有機物除去に関与していることが知られ始めた。例えば、生物学的リン除去プロセスにおける嫌気槽内での有機物除去には、ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の合成が寄与していることが知られている。また一方で、生物学的リン除去プロセスに限らず、標準活性汚泥法といったプロセスにおいても有機物除去過程での一時貯蔵物質の蓄積が報告されている。一時貯蔵物質の蓄積が有機物除去へ寄与していると考えられ始めたことを背景に、活性汚泥プロセスを数学的に表現する活性汚泥モデル¹⁾(Activated Sludged Model No.3)において、有機物の一時貯蔵を表現するプロセスが導入された。

有機物除去過程における一時貯蔵物質の蓄積が知られるようになった一方で、一時貯蔵物質の蓄積が有機物除去にどの程度寄与しているのかを調査した例は少ない。本研究では有機物として酢酸、一時貯蔵物質としてPHAに注目し、PHAの蓄積が酢酸の消費に寄与した割合を明らかにすることを目的とした。そのために、活性汚泥に酢酸を添加した好気培養を行い、培養期間における酢酸、PHA濃度および溶存酸素消費速度を測定した。そして、消費された酢酸の炭素量、CODを含む酸素消費量に関する物質収支およびATPに関するエネルギー収支を計算した。

2. 実験方法

(1) 回分培養および化学分析法

標準活性汚泥法で稼働するA処理場から採取した活性汚泥を回分培養に供した。回分培養は、図1のような装置で行なった。反応槽Aは活性汚泥の呼吸速度(OUR)を測定

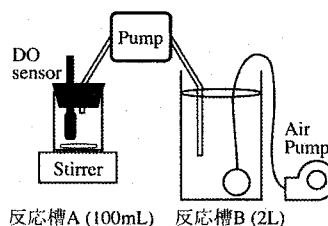


図1. 回分培養装置

するための容器であり、溶存酸素(DO)濃度測定用電極DO24-P (東亜DKK, Japan)が挿入され、密栓されている。反応槽AとBはポンプで接続されており、5分間隔で汚泥混合液の交換が行われる。なお、硝化反応によるDO消費を抑えるため、培養開始前にアリルチオ尿素を終濃度10mg/Lで添加した。培養は計3時間行い、最初の1時間は基質を添加せずに培養を行い、その後酢酸を終濃度40mgC/Lで添加して培養を続けた。酢酸およびPHA測定用の活性汚泥混合液は1時間おきに反応槽Bから採取した。MLSS測定用の試料は培養開始時に採取した。

酢酸濃度はイオンクロマトグラフィー(DX-AQ1110, カラム: AP-12, DIONEX, USA)で測定した。PHAの濃度はガスクロマトグラフィー(GC14A/FID, Shimadzu, Japan)にて測定し、試料調整法および分析条件はTakabatakeら²⁾に従った。MLSSは下水試験法に従い、測定した。

OURは反応槽A内でのDO濃度の減少速度から求めた。酢酸を添加する前のOURは内生呼吸速度とし、酢酸を添加した後のOURから内生呼吸速度を減じたOURを酢酸消費に伴ったOURと判断した。酢酸消費による総酸素消費量はOURを積分して求めた。

(2) 物質収支およびエネルギー収支の計算

PHA合成において酢酸は、1) PHAの基質、2) PHA合成において必要な還元力を供給、3) 反応に必要なエネルギー(ATP)を供給するために消費される。これら1)-3)のために

表 1. 物質収支およびエネルギー収支の計算方法

酢酸の炭素量(mgC/L)に関する物質収支		測定・計算方法
A	総酢酸消費量(炭素量)	実測
B	ATP供給に消費された酢酸の炭素量	計算(1)
B ₁	PHA合成に消費された炭素量	計算(2)
B ₂	バイオマスに消費された酢酸の炭素量	計算(3)
C	PHAの基質として消費された酢酸の炭素量	実測
D	PHA合成における還元力供給に消費された酢酸の炭素量	計算(2)
E	バイオマスの基質として消費された酢酸の炭素量	計算: A-(B+C+D)
PHA合成に消費された酢酸		計算 B ₁ +C+D
CODを含む酸素消費量(mgO/L)に関する物質収支		測定・計算方法
F	総酢酸消費量(COD当量)	計算(1)
G	活性汚泥の総酸素消費量	実測
G ₁	PHA合成反応に必要なとされた酸素量	計算(1)
G ₂	バイオマス合成反応に必要なとされた酸素量	計算(1)
H	蓄積したPHAのCOD当量	計算(1)
I	合成されたバイオマスのCOD当量	計算: F-(G+H)
ATP(mmol)に関するエネルギー収支		測定・計算方法
J	生産されたATP	計算(4)
K	バイオマス合成過程で消費されたATP量	計算(4)
L	PHAの合成過程で消費されたATP量	計算(4)

消費された酢酸の量を評価するために次の収支を計算した: i) 酢酸の炭素量に関する物質収支, ii) CODを含む酸素消費量の物質収支, iii) エネルギー(ATP)収支. 表1にそれぞれの収支における評価項目およびその計算方法を示す. なお, PHA合成の反応は 3HB (3-hydroxybutyrate) によって構成される PHB (polyhydroxybutyrate) の合成反応を想定した. 本来は PHB として表記すべきであるが, PHA との混合を避けるために本論文内では PHA として統一して記述する. ここでは表1で用いた計算方法を説明する.

計算(1)

酢酸(CH_3COOH)およびPHA($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$)のCOD当量から求めた. 酢酸およびPHAのCOD当量は, 酢酸: $24\text{mgC/L} = 64\text{mgO/L}$, PHA: $48\text{mgC/L} = 144\text{mgO/L}$ である.

計算(2)

PHA合成反応は次の式で表される³⁾.

$$8.0 \text{ acetate} + \left(1.0 \text{ acetate} + \frac{9}{(2\delta-1)} \text{acetate} + \frac{18}{(2\delta-1)} \text{O}_2 - \frac{18}{(2\delta-1)} \text{CO}_2 \right) - 2.0 \text{ CO}_2 = 4.0 \text{ PHA} \quad (\text{a})$$

(a)式において, 左辺の第一項は表1のC項に相当し, 第二項は還元力を供給するために必要な酢酸の量, 第三項は一連の反応に必要なATPを供給するために必要な酢酸の量に相当する.

$$\therefore B_1 = \frac{C}{8} \left(\frac{9}{(2\delta-1)} \right), \quad D = \frac{C}{8}$$

計算(3)

バイオマス合成反応は次の式で表される³⁾.

$$\left(0.5 + \left(0.01625 + \frac{3.1925}{(4\delta-2)} \right) \text{acetate} + \frac{6.385}{(4\delta-2)} \text{O}_2 - \left(\frac{6.385}{(4\delta-2)} + \frac{0.065}{2} \right) \text{CO}_2 = \frac{1}{n} (\text{CH}_{1.7n} \text{O}_{0.44n} \text{N}_{0.24n}) \right) \quad (\text{b})$$

(b)式において, 左辺の第一項は表1のE項に相当する.

$$\therefore B_2 = \frac{E}{0.5} \left(0.01625 + \frac{3.1925}{(4\delta-2)} \right)$$

計算(4)

酸素を電子受容体として利用しながらATPを生成する場合, 以下の反応が生じる.

$$1.0 \text{ acetate} = (4\delta-2) \text{ATP} - 2.0 \text{ O}_2 + 2.0 \text{ CO}_2 \quad (\text{c})$$

$$\therefore J = \left(\frac{B}{24} \right) * (4\delta-2), \quad K = \left(\frac{B_2}{24} \right) * (4\delta-2), \quad L = \left(\frac{B_1}{24} \right) * (4\delta-2)$$

δ は電子伝達鎖において酸素1分子を消費した際に生産されるATPの数を表し, 1-3の範囲で値を取ることが知られている. また, δ は微生物種ごとで異なり, pHなどの環境条件によっても変化することも知られている. 今回実施した回分実験における δ は不明であるが, δ を1-3の範囲で連続的に変化させ, ATPに関する収支において生産されたATP(J項)と消費されたATP(K項およびL項の和)の差がゼロになる時の δ を計算に使用した.

PHA合成において, 基質として利用された酢酸の量は表1のC項であり, PHA蓄積に必要な還元力およびATPを供給するために利用された酢酸の量はそれぞれB₁項およびD項である. 本研究ではこれらC, B₁, D項の総和が総酢酸消費量(A項)に占める割合を求めた.

3. 実験結果および考察

(1) 回分培養における酢酸, PHA濃度およびOURの挙動

活性汚泥を好気条件下で培養し, 培養開始から1時間後に酢酸を添加して培養を続けた. その際の酢酸濃度, PHA濃度, OURの挙動を図2に示す. 酢酸消費に伴ない, OURが上昇し, PHAが蓄積された. 総酢酸消費量および蓄積されたPHA量はそれぞれ24.7mgC/L, 8.9mgC/Lであった. 蓄積されたPHAは3HBによって主に構成されており, その他の成分(3HV, 3H2MB, 3H2MV)が占める割合は1%以下だった. OURは酢酸添加前(0-1時間)は約0.007mgO*g-SS⁻¹*hr⁻¹であり, 酢酸添加後に約0.032mgO*g-SS⁻¹*hr⁻¹まで上昇した. 酢酸消費に伴う総酸素消費量は21.5mgO/Lであった.

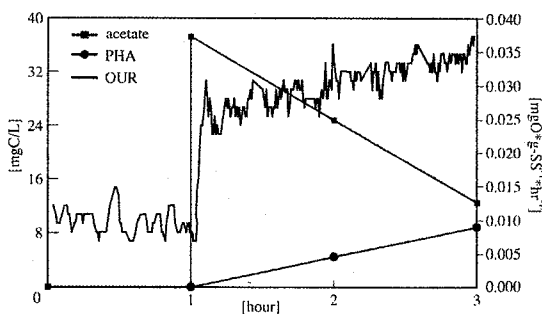


図 2. 酢酸濃度, PHA 濃度および OUR の挙動

(2) 物質収支およびエネルギー収支の計算結果および計算結果の妥当性

酢酸の炭素量, CODを含む酸素消費量に関する物質収支およびATPに関するエネルギー収支を計算した結果を

表2に示す。収支計算の際に用いた δ は2.49とした。PHA合成に用いられた酢酸の総量は12.5mgC/Lであり、その内訳は、基質として消費された酢酸が8.9mgC/L、還元力の供給に用いられた酢酸が1.1mgC/L、ATPの供給に用いられた酢酸が2.5mgC/Lであった。PHA合成に消費された酢酸は総酢酸消費量の51%を占めた。

ここからは表2の計算結果の妥当性を考察する。表2の計算結果に強く影響を及ぼす項目は総酢酸消費量(A項)および蓄積されたPHAの量(C項)である。これらは実測値であり、測定誤差はそれぞれ10%以内であった。この測定誤差が計算結果に及ぼす影響は大きく、PHA蓄積のために消費された酢酸の量が全酢酸量に占める割合は測定誤差の影響で1割程度変化する。一方、総酸素消費量(G項)も実測したOURから求めており、OURは図2に示すように安定した値が得られてなかった。しかし、総酸素消費量に含まれる誤差は表2の結果にあまり影響は及ぼさず、PHA蓄積に用いられた総酢酸消費量が全酢酸消費量に占める割合を数%変化させる程度の影響である。

また、表2の計算に当り、酢酸摂取に必要なATP量は0.5mol ATP/mol acetateとして計算を行ったが、これは溶液のpHと共に0.0~0.5mol ATP/mol acetateで変化することが知られている。今回の仮定値が現実と大きく異なっている可能性があるが、表2の結果にはほぼ結果を及ぼさず、PHA蓄積に用いられた酢酸が総酢酸消費量に占める割合を数%変化させる程度である。さらに細胞内のポリリン酸を分解して得られるATPを表2では無視しているが、培養終了までの溶存態リン濃度の増加量は0.04mmolであり、この全量がポリリン酸の分解に由来すると考えても、表2の結果に及ぼす影響は無視できるほど小さい。

一方で、グリコーゲンなどのPHAとは異なる有機性一時貯蔵物質が活性汚泥内で消費されていた可能性も考えられる。本研究ではPHA以外の一時貯蔵物質を定量していないためこの影響は不明である。

これまでに述べたように、表2の結果は各測定値や計算に用いた仮定値など様々な影響を受けるため、PHA合成に消費された酢酸の量を正確に見積もることは難しい。しかし、正確に評価することはできないが、活性汚泥により消費された酢酸のおおむね半分はPHA合成に用いられたと表2の結果から考えられる。

(3) 酢酸消費におけるPHA蓄積の寄与

有機物除去過程におけるPHA蓄積の寄与を考察する際に、これまでは消費された酢酸と蓄積されたPHAを測定しPHA転換率(mgC/mgC*100)を計算する方法がしばしば用いられてきた。しかし、PHA転換率はPHA蓄積に必要な還元力、ATPを供給するために消費された酢酸を考慮しておらず、PHA蓄積に用いられた酢酸の量を過小評価している。表2からPHA転換率を求めると36%であり、PHA転

表2.物質収支およびエネルギー収支の計算結果

酢酸の炭素量(mgC/L)に関する物質収支	
A 総酢酸消費量(炭素量)	24.7mgC/L
B ATP供給に消費された酢酸の炭素量	8.1mgC/L
B ₁ PHA合成に消費された炭素量	2.5mgC/L
B ₂ バイオマスに消費された酢酸の炭素量	5.6mgC/L
C PHAの基質として消費された酢酸の炭素量	8.9mgC/L
D PHA合成における還元力供給に消費された酢酸の炭素量	1.1mgC/L
E バイオマスの基質として消費された酢酸の炭素量	6.7mgC/L
PHA合成に消費された酢酸	
	12.5mgC/L

CODを含む酸素消費量(mgO/L)に関する物質収支	
F 総酢酸消費量(COD当量)	66.0mgO/L
G 活性汚泥の総酸素消費量	21.5mgO/L
G ₁ PHA合成反応に必要なとされた酸素量	6.7mgO/L
G ₂ バイオマス合成反応に必要なとされた酸素量	14.8mgO/L
H 蓄積したPHAのCOD当量	26.7mgO/L
I 合成されたバイオマスのCOD当量	17.7mgO/L

ATP(mmol)に関するエネルギー収支	
J 生産されたATP	2.7mmol
K バイオマス合成過程で消費されたATP量	1.8mmol
L PHAの合成過程で消費されたATP量	0.8mmol

換率は1割程度の過小評価となっていたことがわかった。

表2から、好気条件下で活性汚泥によって消費された酢酸の内、約半分はPHA蓄積のために消費されていたことが明らかとなった。これは、酢酸の大半がPHAを一時貯蔵物質とする一時貯蔵プロセスを介して除去されており、酢酸の消費にPHA蓄積が強く寄与したことを示すものである。しかし、今回の結果はわずかに種類の活性汚泥から得られたものに過ぎず、酢酸消費へのPHA蓄積の寄与を見積もるには同様の解析を続ける必要がある。

4. まとめ

有機性一時貯蔵物質としてPHAに注目し、活性汚泥による好気的な酢酸消費にPHA蓄積が寄与した割合を評価した。その結果、酢酸のおよそ半分がPHA蓄積を介して消費されていた。

5. 謝辞

本研究は文部科学省科学研究費(若手研究(B), 課題番号17710057「活性汚泥中のPHA蓄積細菌群集の解明と廃水からの生分解性プラスチック生産への応用」)および日本学術振興会特別研究員の助成を受けて遂行したものである。また、活性汚泥試料を提供して下さったかたに対しここに記して感謝の意を表する。

6. 参考文献

1. Gujer, W. *et al.*, (1999) *Water Sci. Technol.* **39**(1), 183-193.
2. Takabatake, H. *et al.*, (2002). *Water Sci. Technol.* **45**(12), 119-126.
3. Van Aalst-van Leeuwen, M.A. *et al.*, (1997) *Biotechnology and Bioengineering* **55**(5), 773-782.