

下水の生物学的高度処理に関する研究

—フロック形成メタン資化性細菌による窒素、リンの除去—

大阪大学工学部 正会員 橋本 榮
藤田正寛
○ 古川憲治
河井洋子

緒言

近年、河川、湖の富栄養化防止と水資源涵養対策として下水二次処理水の再利用を目的とする下水第三次処理は極めて緊急を要する課題となっている。現行の活性汚泥法では、窒素、リンの完全除去が不可能なので、この窒素、リン除去を目的とする下水第三次処理の必要性が出てくる。すでに米国では物理化学的処理法の研究が進められ、実用化の段階にある。一方、最近では下水の生物学的高度処理法も、注目されつつあり、古くより酸化池による太陽エネルギーを利用して藻類による窒素、リン除去法があるが、この方法は処理時間、処理面積、天候等に大きな問題を残し、大々的実用化には致していない。又、窒素のみの除去法として、硝化細菌と嫌気性脱窒細菌による生物処理法があるが、本法は処理法が複雑で窒素除去に限られる短所がある。J. C. Muller⁽¹⁾はサイクロン、カラム醗酵槽を用いてメタン資化性細菌による窒素、リン除去を検討し、極めて効率的に窒素、リンの同時除去が可能なる事を確認した。しかし、菌体と処理水の固液分離には全くふれていないので、下水処理における実用化には問題を残している。今回、演者等は下水処理をクローズドシステムとしてどうえ生物地化学的視点にたち、汚泥の嫌気性消化で生成するメタンガスの有効利用法との兼ね合いより、このメタンガスを炭素源として用い、二次処理水中の窒素、リン、微量金属を菌体内に摂取させ且つ、フロック形成と泥殿分離が極めて良いメタン資化性細菌を培養することにより、二次処理水中の窒素、リンを完全に除去するとともに泥殿分離した培養菌体の飼料等への再利用を目的として本研究を行った。

I. では、純粋分離されたメタン資化性細菌の窒素、リン除去能を、II. では、下水高度処理に適したメタン資化性細菌の分離について、III. では、メタン資化性細菌のフロック形成化について検討を行った。

I. No. 1 メタン資化性細菌による窒素、リンの除去について

実験方法

大阪大学工学部醗酵工学教室田口研究室より分離していただいたNo. 1 メタン資化性細菌を本実験に供した。ガス交換装置付きの500 ml 容ビッド付フラスコに第1表の基本培地を100 ml 分注後、種培養液を5% 容量に接種し、気相を CH_4 50%、 O_2 50%、 CO_2 trace のガスで置換後、30°C ロータリーシェーカーで培養した。窒素、リン除去実験の場合には、上記の方法で生育した菌体を生理食塩水で2回洗浄した後、初発菌体濃度を30~50 mg/l に調整し培養を行った。二次処理水は大阪市

中浜下水処理場のものを使用した。生育菌体量は、乾燥菌体重量にて表示した。 $\text{NH}_3\text{-N}$ はコーンウェイ微量拡散法、又は、インドフェノール法、 $\text{NO}_3\text{-N}$ はコーンウェイ微量拡散法、リン酸イオン、BOD、CODの分析はいずれも下水試験方法によった。

実験結果及び考察

1. No. 1メタン質化性細菌の窒素除去能について

第1表の基本培地の NH_4Cl 濃度を種々変化させてメタン質化性細菌の窒素除去能を種々検討した。その結果を第2表、第3表に示す。

$\text{NH}_3\text{-N}$ は42時間培養で90 p.p.m. 86時間培養で169 p.p.m. 除去され、極めてよい成績が得られた。No. 1株の細胞の元素分析は、古川、田口*によれば、C: 43.31%, H: 7.03%, N: 9.25%であった。第3表にこの結果を基にして算出した窒素回収率を併記している。フラスコ No. 1以外は除去窒素のほぼ100%が細胞内に固定されたことが判明した。

このことは、生育菌体量を知れば、除去窒素量を推定できるとことを示している。ここでフラ

スコ No. 1の場合には窒素飢餓培養状態でメタン質化性細菌が細胞内貯蔵窒素を利用して生育したため、菌体内窒素含量が減少したにもかかわらずN: 9.25%と仮定して窒素回収率を求めたために、200%にもなったものと推察される。従ってメタン質化性細菌を用いて第3次処理を行う場合、二次処理水の供給速度、細菌濃度等をよく制御し、窒素が過不足のないようにすることは、三次処理水水質の安定化に並びに生育菌体の飼料等への取換を考えると重要と考えられる。

2. No. 1メタン質化性細菌のリン除去能について

$\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度を300 p.p.m.に固定し、リン酸イオン濃度を10~80 p.p.m.まで変化させた培地を用い、本菌のリン除去能を検討した結果を第4表に示す。

第1表 基本培地の組成

Compounds	g/l
NH_4Cl	1.0
KH_2PO_4	1.0
Na_2HPO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04
CaCl_2	0.003
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	1.2×10^{-4}
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	4.0×10^{-4}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.0×10^{-5}
ZnCO_3	7.0×10^{-5}
pH 7.0	

第2表 No. 1メタン質化性細菌による窒素除去 (42時間培養)

Flask.No.	$\text{NH}_3\text{-N}$ (ppm)		
	initial	final	removed
1.	75.4	0.85	74.5
2.	177.4	101.0	76.4
3.	296.2	202.7	93.5
4.	396.3	314.7	81.6
5.	463.6	363.4	100.2

第3表 No. 1メタン質化性細菌による窒素除去 (86時間培養)

Flask.No.	$\text{NH}_3\text{-N}$ (ppm)		removed	cell dry weight (g/l)	N-recovery (%)
	initial	final			
1.	75.4	0	75.4	1.62	198.0
2.	177.4	22.4	155.0	1.67	99.7
3.	296.2	126.9	169.3	1.85	91.7
4.	396.3	223.7	172.6	1.94	104.0
5.	463.6	316.7	146.9	1.52	96.0

第4表 No. 1メタン質化性細菌によるリン除去 (91時間培養)

Flask.No.	Ortho-P (ppm)			cell dry weight (g/l)
	initial	final	removed	
1.	10.0	0.01	9.99	0.44
2.	30.7	7.75	23.0	0.58
3.	52.5	33.0	19.5	0.48
4.	78.0	46.6	31.4	0.59

* 昭和46年度日本農芸化学大会発表

リン酸イオンは、91時間培養で最大31.4 p.p.m. 除去され、極めて効率的であった。本実験結果より、単位菌体重量当りの除去リン酸量は一定ではないことが判る。このことは細胞内リン酸濃度が培養環境条件により大きく左右されることを示唆するものである。

3. 窒素、リン除去に及ぼすP/N比について

初発 $\text{NH}_3\text{-N}$ を200 p.p.m. に固定し、リン濃度を種々変化させてP/N比が窒素、リン除去効率に及ぼす影響を及ぼすか検討した結果を第5表に示す。

P/Nが $\frac{1}{5} \sim \frac{1}{20}$ の範囲内では、除去窒素量はほぼ一定であったが、除去リン量は初発リン濃度にある程度依存する傾向がみられた。
。一般に二次処理水

第5表 窒素、リン除去に及ぼすP/N比の影響について

Flask.No	$\text{NH}_3\text{-N}$ (ppm)	ortho-P (ppm)	P/N	$\text{NH}_3\text{-N}$ (ppm)		ortho-P (ppm)	
				final	removed	final	removed
1.	194.6	10.3	1/18.8	128.8	65.1	0.1	10.2
2.	196.0	19.9	1/9.85	135.5	62.7	1.8	18.1
3.	189.6	28.8	1/6.85	109.7	86.3	3.0	25.8
4.	194.6	39.5	1/4.93	120.2	72.2	18.0	21.5

中のP/N比は $\frac{1}{5} \sim \frac{1}{20}$ の範囲内にあると考えられるので、本実験の結果よりメタン酸化性細菌は十分二次処理水中の窒素、リンを同時に効率的に除去し得ると推察される

4. No. 1メタン酸化性細菌の生育に及ぼすBODの影響について

第1表の基本培地に合成下水を種々添加し、生育菌体量に及ぼす影響を検討した結果を第6表に示す。

BODが1,000

第6表 BODのNo. 1メタン酸化性細菌の生育に及ぼす影響について

添加BOD	0	100	250	500	1,000	2,500	5,000	10,000
生育菌体量 (66時間)	1.70	1.56	1.37	1.30	1.08	1.60*	3.25*	4.80*

* 培養43時間

の生育がみられたが

、この範囲内ではBOD値が増加するにつれ生育菌体量が減少し生育が阻害された。BODが1,000 p.p.m.以上になると明らかにメタン酸化性細菌以外の雑菌の生育が観察された。従って二次処理水中のBODが年平均20 p.p.m.前後であることを考慮に入れば、二次処理水中でメタン酸化性細菌は有機物による生育阻害を受けることなく生育することが可能であると考えられる。

5. 二次処理水中でのNo. 1メタン酸化性細菌の生育について

以上種々検討の結果、No. 1メタン酸化性細菌は二次処理水中で生育可能で、二次処理水中の窒素、リンを十分効率的に除去し得るものと推察される。そこで実際に中浜下水処理場の二次処理水を培地として本菌の培養試験を行つた。供試二次処理水の分析結果を第7表に、バッチ培養試験の結果を第8表に示す。培養3日後に $\text{NH}_3\text{-N}$ は97%以上除去され残存濃度は0.6 p.p.m.以下に、リン酸イオンは96%以上除去されて残存濃度は0.1 p.p.m.以下に減少した。又、用いた二次処理水中のCODは培養前後で変化がなく、このことは二次処理水中でのメタン酸化性細菌は、メタンを唯一の炭素源とし

第7表 二次処理水の分析結果

$\text{NH}_3\text{-N}$	17.0	ppm
Ortho-P	3.2	ppm
BOD	8.3	ppm
COD	15.2	ppm

第8表 No.1メタン資化性細菌による二次処理水中の窒素、リン除去

Flask.No	NH ₃ -N (ppm)		NH ₃ -N removal (%)	ortho-P (ppm)		ortho-P removal (%)	COD (ppm)	
	initial	final		initial	final		initial	final
1.	17.0	0.54	96.6	3.2	0.12	96.3	15.2	16.0
2.	17.0	0.54	96.6	3.2	0.17	94.7	15.2	15.8
	a.v.96.6			a.v.95.5				

て利用することを示唆している。

II. フロック形成メタン資化性細菌の分離と窒素、リン除去について

実験方法

分離用接種源として平野川ニヶ所の表層水、メタンガス貯蔵ガス槽の水（中安下水処理場）、消化槽脱離液の吐口の泥土（中安下水処理場）を選び、第9表に示す分離用培地を用いて古川、田口の方法に従いメタン資化性細菌の分離を行った。⁽²⁾ 培養温度は40℃とした。生育菌体量の測定はバイブレーターでフロックを良く分散した後、540mμの吸光度を測定しO.D.540値で表示した。

実験結果

供試のすべての接種源用試料から、メタン資化性細菌の増殖を認めた。この中からフロック形成能と増殖能の高い平野川表層水から得られたメタン資化性細菌を集殖し、以後の実験に供した。

1. 微量金属元素の要求性について

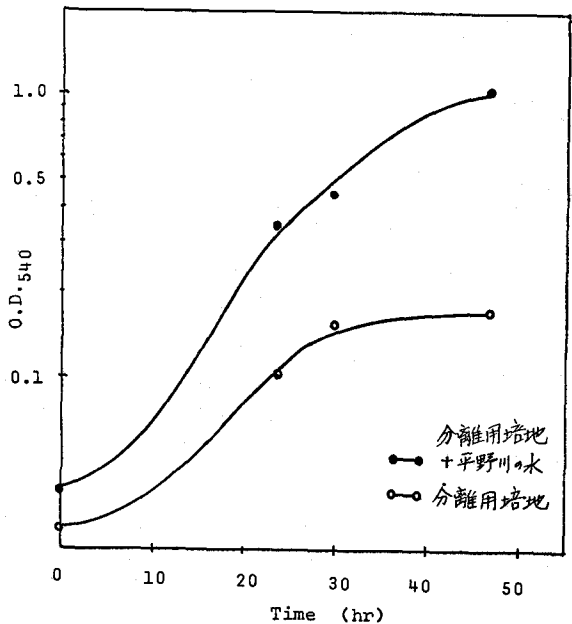
集殖培養を重ねるにつれ、メタン資化性細菌の増殖能が低下した。そこで平野川の表層水5mlを分離用培地に添加したところ、明らかな添加効果がみられた。（第1回）

このことから、メタン資化性細菌が微量金属あるいは生育因子を要求することが推察される。そこで分離用培地に微量のZn、Mn、Cu、Co、Mo、イオンを添加した培地と、その上にビタミン混合液を添加した培地上での生育を、両者いずれも加えない分離用培地での生育と比較したが、第2回である。

ビタミン混合液の添加効果はみられなかったが、金属塩の添加効果は著しい。

第9表 分離用培地の組成

Compounds	g/l
KH ₂ PO ₄	1.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.4
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.3
Na ₂ HPO ₄	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4 × 10 ⁻²
CaCl ₂	3 × 10 ⁻³
Fe ₂ (SO ₄) ₃	1.2 × 10 ⁻⁴
pH 7.0	

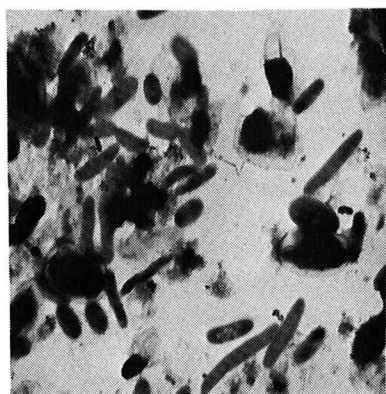


第1回 平野川の表層水の添加効果について

次に、これら5種の金属イオンについて各金属単独の添加効果を検討した結果が第3図である。銅イオンの添加効果が大きく本菌の生育には銅イオンが必須である事が判明した。以上、実験結果より本菌の最適培地は分離用培地に銅イオンを添加したものとした。最適培養条件下での最大比増殖速度は0.20 hr⁻¹で極めて大きい。

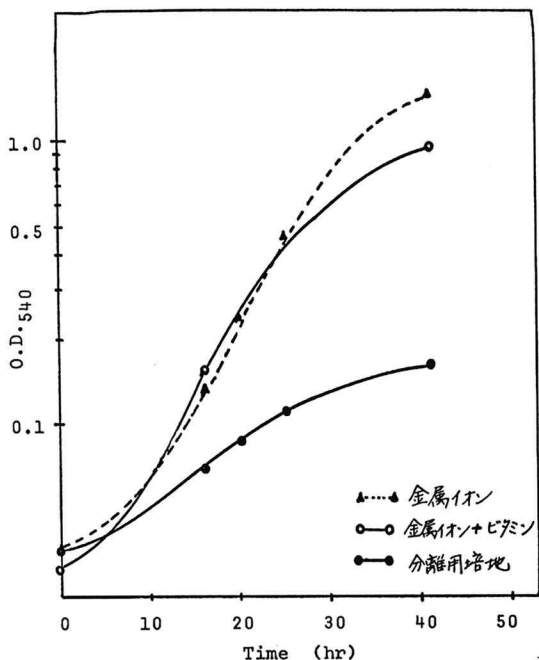
2. 分離メタン酸化性細菌の特性

分離メタン酸化性細菌は種々の特性を有する。まず第一に第4図の電子顕微鏡写真から明らかのように長桿菌と短桿菌から成る混合培養である。写真から長桿菌と短桿菌は1:5の割合で混合している。M. J. Johnson, J. C. Muller等⁽¹⁾は連続培養で長期間培養を続けた場合、混合メタン酸化性細菌のいずれか一方が優勢となることを報告している。それ故、分離株は現時点では混合培養となっているが、培養を続けるにつれて菌株が選択され、短桿菌が長桿菌のいずれか一方が優勢となる可能

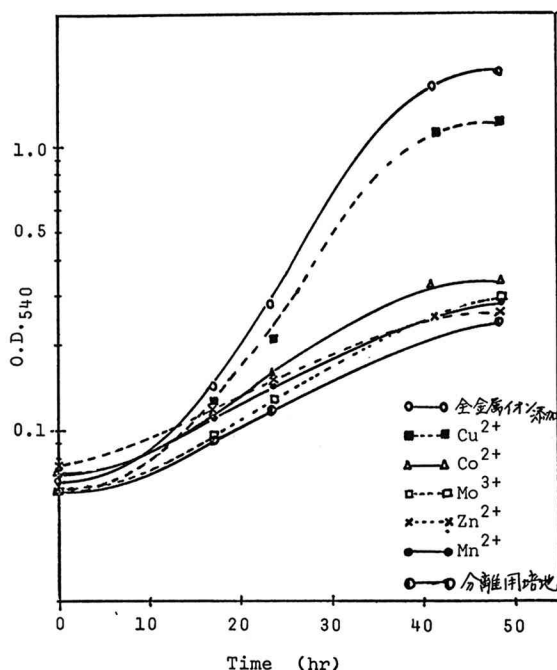


第4図 フロック形成メタン酸化性細菌の電子顕微鏡写真
(5000倍)

1μ



第2図 フロック形成メタン酸化性細菌の増殖に及ぼす金属イオン、生育因子の影響



第3図 フロック形成メタン酸化性細菌の増殖に及ぼす金属イオン添加効果

性が大きいものと考えられる。第二に生育最適温度が40°Cと高く、しかも生育速度が大きい。P. S. Vary, M. J. Johnson⁽³⁾, 西野、古川、田口⁽⁴⁾はメタン資化性細菌の分離を40°Cで行うと生育速度の大きいメタン資化性細菌が得られたことを報告している。筆者が行った今回の分離でも同様の結果が得られた。今日まで報告されているメタン資化性細菌のうち生育速度の大きいものは、いずれも40°C附近に生育最適温度を有することは非常に興味ある事実である。第三の特性は分離メタン資化性細菌がフロック形成能を有することである。メタン資化性細菌を下水処理に応用する場合、固液分離が大きな問題として持ち上がってくる。醗酵工業で行っている遠心分離等の固液分離法は、経済性の面から、操作の面から応用は不可能である。それ故、分離メタン資化性細菌がフロック形成能を有することは、それを微生物蛋白製造に応用する場合、生育速度低下の原因として極度に避けられる性状ではあるが、それを下水処理に応用する場合に是非常に好ましい性状であると言える。分離メタン資化性細菌の持つフロック形成能ではまだまだ固液分離は完全であるとは言えない。今後、Ⅳで述べる方法等の併用を考慮する必要がある。

3. フロック形成メタン資化性細菌による窒素、リン除去について

NH₃-N 17.0 ppm, リン酸イオン 3.1 ppm, COD 16.0 ppmの二次処理水を培地として本菌の培養を行、た結果を第10表に示す。

第10表 フロック形成メタン資化性細菌による二次処理水中の窒素、リン除去について

incubation period (hr)	NH ₃ -N (ppm)		removed (%)	ortho-P (ppm)		removed (%)	COD (ppm)	
	initial	final		initial	final		initial	final
24	17.0	>0.43	>97.5	3.1	>0.1	>96.7	16.0	17.3
45		>0.43	>97.5		>0.1	>96.7		30.0

24時間後にNH₃-Nは、97.5%以上除去され残存濃度は0.43 ppm以下に、リン酸イオンは96.7%以上除去され残存濃度は0.1 ppm以下になり前述のNo. 1メタン資化性細菌に比して極めて除去速度が早い。二次処理水のCODは17.3 ppmとわずかに上昇した。さらに培養を45時間まで続けたところ、CODは30.0 ppmにも上昇した。これは24時間目の菌体量より45時間目の菌体量の方が少いことから示唆されることであるが、栄養状態悪化による菌の溶解現象に基づくものであろうと推察される。メタン資化性細菌を第三次処理に応用する場合には、生育環境条件の悪化は菌の溶解、ひいてはCOD値の上昇を招くのでこの点に対する留意が必要である。

Ⅳ. メタン資化性細菌のフロック形成化について

前節で述べたようにメタン資化性細菌を使い下水第三次処理を行う場合、固液分離は凝集により行うのが最も経済的かつ操作が簡単である。そこでここでは種々の凝集剤、凝集補助剤使用によるメタン資化性細菌のフロック形成化について述べる。

実験方法

フロック形成能を有しないNo. 1メタン資化性細菌を第1表の基本培地で培養後、ビーカー内で培養液をマグネティック スターラーで攪拌しながら種々の凝集剤、凝集補助剤を適当濃度添加した。

後、NaOH、HClにて最適凝集pH値に調節してフロック形成を行い沈降実験に供した。細胞除去率は次式にて求めた。

$$\text{細胞除去率(\%)} = \frac{(O.D.540)_i - (O.D.540)_f}{(O.D.540)_i} \times 100$$

$(O.D.540)_i$; 凝集剤添加前 9540 mμ における吸光度

$(O.D.540)_f$; 凝集沈降後の 540 mμ における吸光度

凝集剤として $FeCl_3$ 、 $ZnCO_3$ 、 $Al_2(SO_4)_3$ 、 $MgSO_4$ 、凝集補助剤として CaO 、 $CaCO_3$ 、ゼオライト、クリノプタロライト、ベントナイト、活性ケイ酸、サンゴ化石を使用した。

実験結果

凝集沈降実験の結果を第11表に示す。

第11表 凝集沈降実験の成績

凝集剤	添加濃度 (ppm)	補助剤	pH	凝集沈降後の上澄液混濁度	沈降速度	細胞除去率 (%)
$FeCl_3$	560	$CaCO_3$	6.0	+	**	95.0
"	"	-	7.0	-	*	
$ZnCO_3$	680	-	8.0	-	*	
$Al_2(SO_4)_3$	50	ゼオライト	5.5-6.0	++	**	99.9
"	"	クリノプタロライト	"	+	*	
"	"	ベントナイト	"	+	*	
"	"	活性ケイ酸	"	++	**	95.4
"	"	サンゴ化石	"	+	*	89.5
$MgSO_4$	60	CaO	11.0	++	**	99.0
"	"	$CaO^{(a)}$	8.0	++	**	91.4
"	"	-	11.0	-	*	

+ 細胞除去率 90%以上

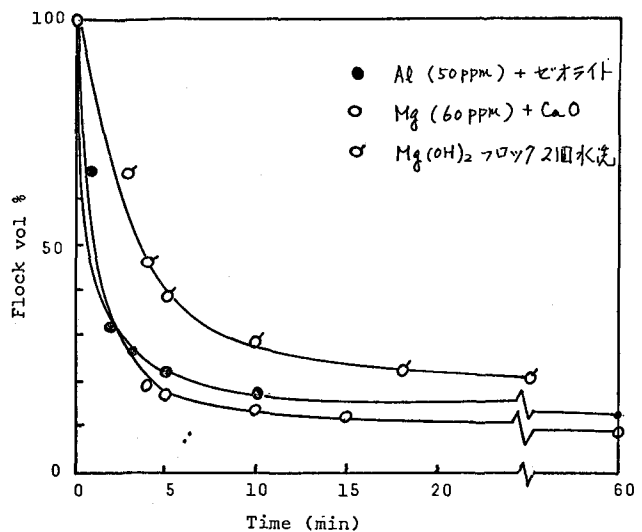
++ " 80-90%

(a) フロックを2回沈降後使用

* 15分後のフロック高が 15-25%

** " が 15%以下

上記の実験結果より $FeCl_3$ は添加量に、 $ZnCO_3$ は凝集沈降による固液分離に問題がある。 $Al_2(SO_4)_3$ は種々の凝集補助剤との組合せにより、ほぼ中性付近で沈降速度の大きなフロック形成が行われ、しかも 95-99% の高い細胞除去率が得られた。特に、 $Al_2(SO_4)_3$ とゼオライトとの組合せは、沈降時間12分で 99% の高い細胞除去率が得られた。(第11表参照) 基本培地に 50 ppm の Al^{3+} とゼオライト 500 ppm を添加した培地におけるメタン酸化性細菌の生育と基本培地における生育を比較したところ、両者に



第5回 $Al(OH)_3$ 、 $Mg(OH)_2$ フロックの沈降特性

差異はなく、しかも沈降菌体を新しい基本培地に植え継いでも正常の発育を示すことより、 $Al_2(SO_4)_3$ はメタン酸化性細菌の凝集剤としては効果的なものであるといえる。しかし、沈降菌体の飼料あるいは肥料等への転換利用を計る場合、 Al の毒性が問題となる可能性が高く今後の研究課題である。

$MgSO_4$ を凝集剤に、 CaO を凝集補助剤として凝集沈降を行うと、凝集最適 pH が 11.0 以上となり、凝集菌体の返送あるいは処理水の pH 調整が大きな問題となるであろう。そこで $Mg(OH)_2$ のフロックをエロ花稈後細胞懸濁液に添加すると、pH 8.0 で凝集沈降が起った。(第 5 回参照) 以上、種々の凝集剤による固液分離実験の結果、メタン酸化性細菌の細胞分離に活用可能な凝集剤、凝集補助剤の組合せとして $Al_2(SO_4)_3$ - ゼオライト、 $MgSO_4$ - CaO が適当と考えられる。

要約

1. 材料分離された No. 1 メタン酸化性細菌を用いて培地中の窒素、リン除去を調べたところ極めて効果的に除去し得ることが判明した。
2. 二次処理水を培地として No. 1 株を培養したところ、回分培養で 100% 近い窒素、リン除去率が達成された。
3. 下水高度処理に使用可能なメタン酸化性細菌の分離を目的として集菌培養を行い、生育速度が大きく、フロック形成能力を有するメタン酸化性細菌の分離に成功した。分離メタン酸化性細菌は短桿菌と長桿菌から成る混合培養で $40^\circ C$ に生育最適温度を有し、 Ca^{2+} が生育必須元素であった。
4. 人工的にフロック形成を起させることを目的として、種々の凝集剤、凝集補助剤の組合せを検討したところ、 $Al_2(SO_4)_3$ - ゼオライト、 $MgSO_4$ - CaO が有効であることが明らかとなった。

参考文献

- (1) J. C. Muller : J. Water Poll. Control Fed., 44, 25 (1972)
- (2) 古川、田口 : 昭和 46 年度日本農芸化学大会講演要旨集., 134
- (3) P. S. Vary, M. J. Johnson : Appl. Microbiology., 21, 511 (1971)
- (4) 西野、古川、田口 : 昭和 47 年度日本農芸化学大会講演要旨集., 1