

## (21) 嫌気好気式活性汚泥法の

### リン除去と活性汚泥細菌相

#### PHOSPHORUS REMOVAL AND BACTERIAL FLORA OF ANAEROBIC-AEROBIC ACTIVATED SLUDGE PROCESS

都 筑 良 明\*      味 埜 俊\*      松 尾 友 矩\*

Yoshiaki TSUZUKI\*, Takashi MINO\*, Tomonori MATSUO\*

**Abstract;** In the batch operation of laboratory scale anaerobic-aerobic activated sludge(AS) process, two operating conditions were compared. In the case of "Supernatant Withdraw Operation (SWO)"—the normal operation of AS, supernatant was withdrawn as effluent. In the case of "ML Withdraw Operation (MWO)"—the normal operation of pure culture, only small amount of mixed liquor was withdrawn. Phosphorus removal reduced after the change of operating conditions from SWO to MWO. However, after ninety days of MWO, recovery of enhanced phosphorus removal was observed for a month. It was unable to maintain this phosphorus removal for longer period under MWO.

In the enhanced phosphorus removal ASs, 18 to 50% of total isolates were identified as Acinetobacter calcoaceticus var. lwoffii by the API20E System, while only one isolate was identified by the API20NE System. No isolate of low phosphorus removal AS was identified as Acinetobacter by either System. One of the bacteria playing a functional role on enhanced phosphorus removal may, therefore, be identified as Acinetobacter calcoaceticus var. lwoffii by the API20E System, but not by the API20NE System.

The isolates which could not be identified to the genus level was 52% of the total isolates. The cluster analyses were applied to classify all these isolates effectively. The enhanced and low phosphorus removal ASs were clearly distinguished by the Ward method.

**Keywords;** Anaerobic-aerobic activated sludge process, Acinetobacter, API, Biological phosphorus removal, Cluster analysis, Ward method

## 1. はじめに

下水からのリン除去の方法の1つに、通常の活性汚泥法の曝気槽前半部に嫌気槽を設けた嫌気好気式活性汚泥法がある。COD(Cr)の除去量に対するリンの除去量の割合は、通常の活性汚泥法の場合1%程度であるのに対して、嫌気好気式活性汚泥法の場合2-4%あるいはそれ以上になる。このリン除去能力の上昇は、活性汚泥内細菌がポリリン酸を蓄積することによる(Mino et al.(1984), Miya et al.(1984))。この現象の解明には、大きく分けて、リン除去に寄与する細菌の種類の解明と、それらの活性汚泥内細菌の代謝機構の解明の2つの面のアプローチが考えられる。本研究では、前者の細菌の種類の解明の面からの検討を行った。ポリリン酸を蓄積している細菌は、Fuhs and Chen(1975)以来、グラム陰性桿菌の Acinetobacter であると言われてきた。Brodisch(1985), Lotter(1985)は、ポリリン酸蓄積菌は、Acinetobacter であるとしており、このとき、単離した活性汚泥細菌の同定に、グラム陰性桿菌用同定簡易システムであるAPI20Eを用いている。しかしながら、医学細菌用のシステムを使用して、そのまま活性汚泥細菌の同定を行えるかどうかは疑問である。また、最近、中村ら(1988)は、嫌気好気式活性汚泥法から単離した細菌で、ポリリン酸蓄積能力を持ち、嫌気好気でのリンの放出、摂取を

\*東京大学工学部都市工学科 (Dept. of Urban, Environment & Sanitary Engineering, Univ. of Tokyo)

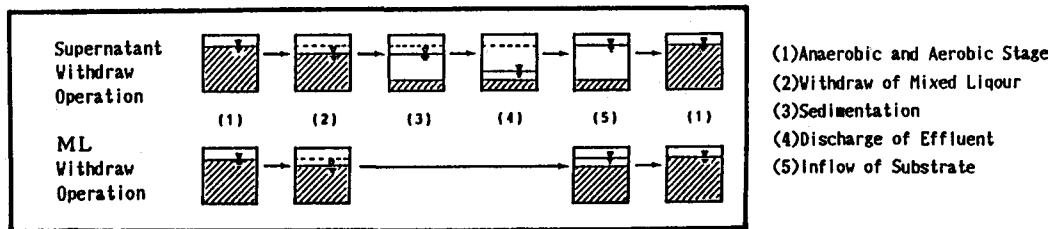


Figure 1. "Supernatant Withdraw Operation" and "ML Withdraw Operation".

行ったのは *Micrococcus* 状の球菌であったと発表している。保存菌株の *Pseudomonas aeruginosa* でも嫌気、好気過程でリンの放出、摂取があることが報告された(Ye et al. (1988))。これらのことから、現段階では嫌気好気式活性汚泥法で優占し、ポリリン酸を蓄積する細菌が *Acinetobacter* だけであるというのは疑問である。

一方、嫌気好気式活性汚泥法の活性汚泥から単離したリン含有率の高い細菌について、その代謝活動を調べるということが行われている(例えば Deinema(1985), Groenestijn and Deinema(1987))が、一般に、純粋菌の培養は、高濃度基質を用い、水の引き抜きは菌体混合液 (ML) の引き抜きにより行われ、通常の活性汚泥法の運転にみられるような沈殿による固液分離とそれに引き続く上澄みの流出は行われない。このことにより、菌体の滞留時間 (CRT: 活性汚泥法での SRT に相当) と HRT とが等しくなっている。ここでは、このような系を「ML 引き抜き式」、通常の活性汚泥に見られるような、沈殿による固液分離後、上澄みの流出を行う方式を「上澄み引き抜き式」と、それぞれ呼ぶこととする。回分式嫌気好気式活性汚泥法において、ML 引き抜き式の運転を行うと、リン除去が悪化する(都築ら(1986, 1987))。高濃度基質を用いた HRT の大きい運転条件では、連続槽を用いた場合においても、リン除去が良好でなかったことが報告されている(Fukase et al. 1984)。以上のことから、活性汚泥を ML 引き抜き式で培養したときのリン除去について検討することは、純粋培養の培養条件を考える上で重要であると考えられる。嫌気好気式活性汚泥法を ML 引き抜き式で運転した場合のリン除去についてはまだよく調べられていない。

以上の点を踏まえ、本研究では、ML 引き抜き式、上澄み引き抜き式での嫌気好気式活性汚泥法のリン除去、および、嫌気好気式活性汚泥法の活性汚泥細菌相について検討を行った。また、併せて、活性汚泥細菌を対象とした場合の API システムの有効性についても検討した。

## 2. ML 引き抜き方式でのリン除去

### 2.1 反応槽の運転条件と分析項目

実験には、A, B, 2つの回分式反応槽を用い、反応槽内の混合液の量はそれぞれ 16、1.6 L とした。反応槽 A に用いた活性汚泥は、嫌気好気式活性汚泥法の実験室内プラントの余剰汚泥を 4°C で保存しており、これを用いた。運転は回分式、1 サイクルは、嫌気 1 時間、好気 2 時間、沈殿時間 1 時間の計 4 時間とし、沈殿時には、ML 引き抜き式、上澄み引き抜き式のいずれにおいても、攪拌、曝気を停止した。人工下水の流入は嫌気の初めに、混合液の引き抜きは好気の終わりに行い、上澄み引き抜き式の場合には曝気、攪拌停止後約 30 分の時点で上澄みの引き抜きを始めた。両方式の運転方法を図 1 に示す。実験に用いた人工下水の基質組成および用いた期間を表 1 に示す。表中の下から 2 段目の COD, T-P の値は、基質流入前の反応槽内のそれぞれの濃度を 0 としたときの基質流入後の槽内上澄み濃度の計算値である。反応槽 A には、表の①から⑤を、反応槽 B には⑥を使用した。実験は、20°C の恒温室内で行ったが、途中恒温室の事故のため反応槽の水温が 30°C 前後まで上昇した。反応槽内の水温の継

日変化を図2に示す。

反応槽Aは、最初上澄み引き抜き式の運転を行い、良好なリン除去を確認した後、103日めからはML引き抜き式の運転を行った。最初、汚泥の引き抜き量を1ℓ/日程度としたが、実験開始後90日めより2ℓ/日とした。これによりSRTは、反応槽全体に対して8日となる。表1の基質②から⑤への変更は、反応槽内の塩濃度、およびリン濃度を減少させ、通常の活性汚泥法で見られるようなレベルに近づけることを目的として行った。

運転方式変更後、リン除去の悪化していた反応槽Aの引き抜き汚泥2ℓ分を使い、130日めに、反応槽Bの運転を開始した。反応槽Bは、実験期間を通して上澄み引き抜き式の運転を行った。汚泥の引き抜き量は、0.2ℓ/日、SRTは8日とした。

反応槽での、有機物、リンの除去の様子を知るため、数日おきに、上澄みのTOC、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、T-P、および、混合液のMLSS、MLVSS、T-Pの各指標を測定した。

## 2.2 反応槽の運転結果

まず、反応槽Aの運転結果について述べる。上澄みTOC、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、汚泥中のMLSSあたりのリン含有率等の各指標の継日変化を図3に示す。103日めまでの上澄み引き抜き式の間、リン除去は良好であった。好気終わりでの上澄みの $\text{PO}_4\text{-P}$ は、ほぼ0.5mg/ℓ以下で安定し、汚泥中のリン含有率は、培養開始時には1.5%であったのが、60日めには4.1%となり、以後運転条件を変更するまでは4%前後の値であった。

103日めにML引き抜き式に運転条件を変更した後、リン除去は悪化した。103日めで4.6%であったリン含有率は、104、105日めに、それぞれ4.2、3.9%と漸減し、152日めには、1.6%となった。

ML引き抜き式の運転を続けたところ、195日めに、好気の終わりの $\text{PO}_4\text{-P}$ が19.5mg/ℓに減少し、リン含有率は、3.5%まで増加した。202-222日の間、好気終わりの $\text{PO}_4\text{-P}$ は0.0-0.37mg/ℓであり、基質中のリンはほとんどが活性汚泥に取り込まれていた。この間の

Table 1. List of composition of substrates(mg/l)

|                                                     | ①(*1) | ②    | ③    | ④    | ⑤    | ⑥(*1) |
|-----------------------------------------------------|-------|------|------|------|------|-------|
| Pepton                                              | 7200  | 4320 | 4320 | 4320 | 3240 | 240   |
| Yeast Extract                                       | 3000  | 1800 | 1800 | 1800 | 720  | 100   |
| $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  | 4800  | 2860 | -    | -    | -    | 160   |
| $\text{CH}_3\text{COOH}$                            | -     | -    | 1260 | 1260 | 3240 | -     |
| Gulcose                                             | 2100  | 1260 | 1260 | 1260 | -    | 70    |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            | 900   | 100  | 100  | 50   | 50   | 30    |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                        | 2700  | -    | -    | -    | -    | 90    |
| $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 3300  | 150  | 150  | 150  | 150  | 110   |
| $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$            | -     | 30   | 30   | 30   | 30   | 20    |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | -     | 650  | 650  | 325  | 325  | -     |
| Reactor                                             | A     | A    | A    | A    | A    | B     |
| Reactor Vol. (L)                                    | 16    | 16   | 16   | 16   | 16   | 1.6   |
| Feed : Inflow(L)                                    | 0.2   | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.6   |
| Water: Inflow(L)                                    | 5.8   | -    | -    | -    | -    | -     |
| Caluculated concentration after inflow              |       |      |      |      |      |       |
| COD(mg/l)                                           | 180   | 180  | 180  | 180  | 150  | 180   |
| T-P(mg/l)                                           | 5.1   | 2.4  | 2.4  | 1.6  | 1.1  | 5.1   |
| Used Period                                         | 1-    | 103- | 152- | 185- | 449- | 130-  |
| (DAY)                                               | 103   | 152  | 185  | 449  | 560  | 273   |

(\*1)Concentration of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was sometimes altered. Generally, when phosphorus concentration at the end of aerobic phase was high,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was decreased.

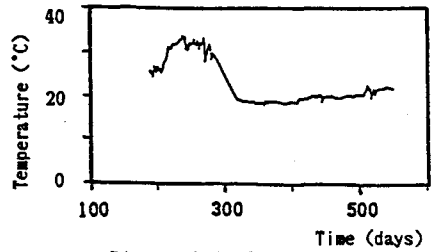


Figure 2-1. Reactor A.

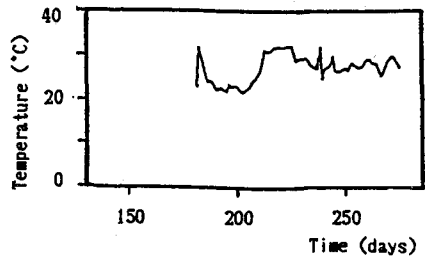


Figure 2-2. Reactor B.

Figure 2. Profiles of Water Temperature.

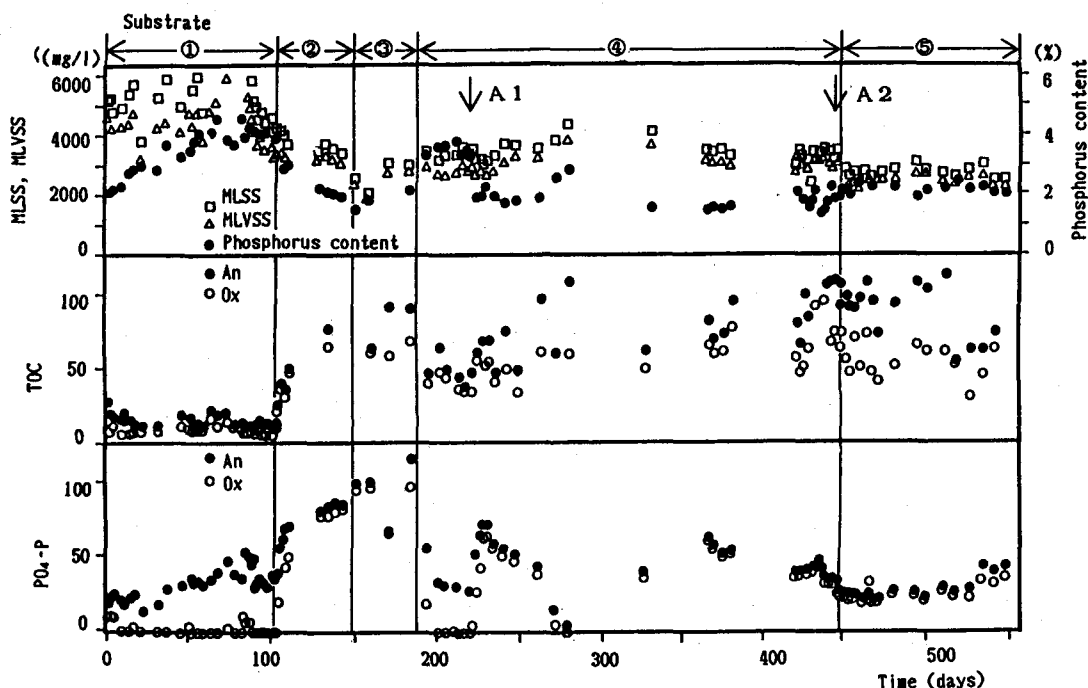


Figure 3. Profiles of operational parameters of reactor A with "Supernatant Withdraw Operation" (①) and "ML Withdraw Operation" (②-⑤).

リン含有率は、3.4-3.9%で安定していた。この後、リン除去は一度悪化したが、好気時間の曝気量が小さくなっていたので曝気量を元に戻したところ274-281日めに、再び良好なリン除去が観察されるようになった。その後、330日めには、リン除去が悪化しているのが観察され、449日めの基質の④から⑤への変更後も良好なリン除去は見られなかった。

次に、反応槽Bの結果について述べる。上澄み $PO_4-P$ 、汚泥中のリン含有率等の各指標の継日変化を図4に示す。上澄み引き抜き式で、嫌気好気過程での培養を続けたところ、次第に良好なリン除去を示すようになっていった。41日めには、汚泥中のリン含有率は5.3%、好気終わりの $PO_4-P$ は、0.1mg/gであった。その後、若干の変動はあったものの、良好なリン除去が続いた。84日めから96日めにかけて、水温が $30^{\circ}C$ 前後に上昇したのとほぼ同時にリン除去が悪化した。そのまま運転を続けると、99,101日めには、水温がそれぞれ $32.5, 29.0^{\circ}C$ と高かったにもかかわらず、好気終りの $PO_4-P$ が、0.4mg/g、リン含有率がそれぞれ4.5, 4.0%と良好なリン除去を示すようになった。

### 2.3 上澄みの流出のあり、なしのリン除去への影響

上で見たように、回分式嫌気好気式活性汚泥法で上澄み引き抜き式をML引き抜き式に変更した場合、リン除去の悪化が観察された。これは都筑ら(1986,1987)の結果に一致する。これに対して、ML引き抜き式での良好なリン除去が、今回初めて観察された。これは、嫌気好気式活性汚泥法を単離菌の純粹培養、または、混合培養で再現する際に、上澄み引き抜き式、ML引き抜き式の運転条件の違いについては、克服できるであろうということを示したものである。ここでは、反応槽の運転結果に基づき、上澄み中の塩濃度、および水温のリン除去に及ぼす影響について若干の考察を加える。

回分式嫌気好気式活性汚泥法のML引き抜き式でのリン除去の悪化の原因について、都筑ら(1986、

1987) は、高い塩濃度による阻害、反応槽上澄みに蓄積した難分解性有機物の影響を考えている。塩濃度の阻害は、希釈し尿の嫌気好気式活性汚泥法による処理を考える場合に重要な問題となる(松尾ら(1988))。今回観察されたML引き抜き式での良好なリン除去は、基質の②から③、④への変更の後に起きた。これらの変更により基質中のナトリウムは 525mg/l, カリウムは 14mg/l 減少した。良好なリン除去が行われた原因の1つとして、この塩濃度の減少が考えられる。

しかしながら、このML引き抜き式で良好なリン除去が観察された期間は、反応槽の水温が30°C以上へと上昇していった時期と重なる。このことから、原因の1つに水温も考えられる。水温に関しては、反応槽Bでは、水温の22°Cから32°Cへの上昇に伴うリン除去の悪化が一時的には観察されたが、運転を継続することにより、水温が30°Cのときにも良好なリン除去を示すようになった。以上のように、水温とリン除去の間には複雑な関係があると推測される。

活性汚泥から単離した細菌による純粋培養、あるいは、いくつかの細菌による混合培養によって嫌気好気式活性汚泥法の現象を再現する場合にML引き抜き式と上澄み引き抜き式の培養条件の違いは、克服できであろうことが示されたが、安定して良好なリン除去を得るためには、水温、塩濃度などについて更に検討が必要である。

### 3. 活性汚泥細菌相の検討

#### 3.1 細菌の単離、同定方法

細菌の単離、同定は以下の手順で行った。

図3、4の矢印A1、A2、Bのときに、反応槽より5mlの混合液をサンプリングし試験管にとり、サンプルA1、Bは、超音波破砕機(大岳製作所OT-5202)で、40W、10秒の超音波破砕を行い、サンプルA2は、ミキサー式ホモジナイザー(ヤマトKL-21)で60秒間処理した。A1、Bのサンプリング時には、予備実験で、40Wでは5分のときにコロニー数が最大となることが分かっていたが、この時、同時に単離菌によるリン蓄積の再現を行うことも考えていたため、超音波破砕によって細菌のリン除去能に悪影響を与える可能性を考慮して、10秒とした。用いた希釈水は表1.⑥の基質中の無機塩類のみの溶液(PH 7.0)、寒天培地は表1.⑥の基質に寒天(キング1級)を1gあたり15g加えたもの(PH 7.0)とした。コンラージ法を用い、培養温度は20°Cとした。培養開始後2週間以上経ったプレートで、コロニー数が20-40個程度のものを選び、すべてのコロニーをピックアップし、同じ基質組成の寒天培地に植え継いだ。単離できたと思われる細菌についてグラム染色を行った。グラム陰性の桿菌は、

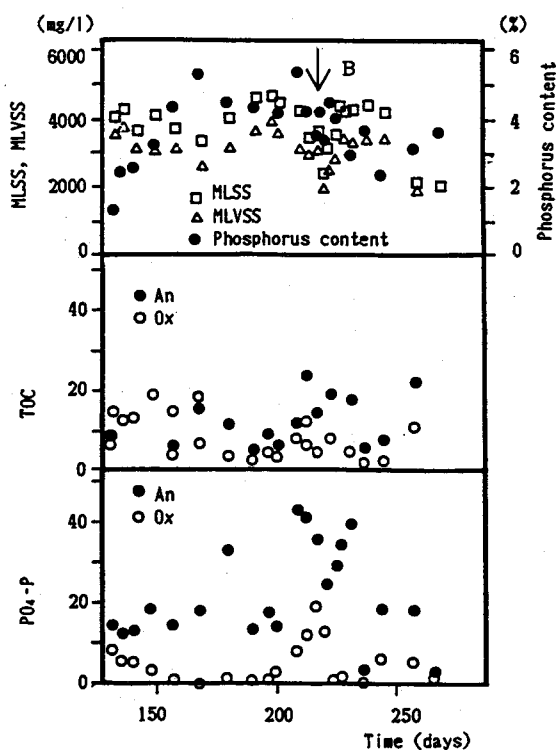


Figure 4. Profiles of operational parameters of reactor B with "Supernatant Withdraw Operation".

Table 2. List of genera included in

API20E and API20NE systems.

| Bacterial genera       | Number of strains<br>(#1) |         |
|------------------------|---------------------------|---------|
|                        | API20E                    | API20NE |
| Escherichia            | 5                         |         |
| Shigella               | 3                         |         |
| Edwardsiella           | 3                         |         |
| Salmonella             | 8                         |         |
| Citrobacter            | 2                         |         |
| Klebsiella             | 5                         |         |
| Enterobacter           | 10                        |         |
| Erwinia                | 1                         |         |
| Hafnia                 | 1                         |         |
| Rahnella               | 1                         |         |
| Cedecea                | 1                         |         |
| Ewingella              | 1                         |         |
| Serratia               | 7                         |         |
| Buttiauxella           | 1                         |         |
| Kluyvera               | 1                         |         |
| Proteus                | 3                         |         |
| Morganella             | 1                         |         |
| Providencia            | 3                         |         |
| Tatumella              | 1                         |         |
| Yersinia               | 7                         |         |
| Aeromonas              | 2                         | 1       |
| Plesiomonas            | 1                         | 1       |
| Vibrio                 | 7                         | 4       |
| Pasteurella            | 3                         | 5       |
| Chromobacterium        | 1                         | 1       |
| Pseudomonas            | 8                         | 14      |
| CDC group (#2)         | 5(#2)                     | 7(#3)   |
| Acinetobacter          | 2                         | 3       |
| Moraxella              | 1                         | 4       |
| Flavobacterium         | 3                         | 4       |
| Bordetella/Alcaligenes | 1                         |         |
| Bordetella             |                           | 1       |
| Alcaligenes            |                           | 2       |
| Achromobacter          | 1                         | 2       |
| Acrobacterium          |                           | 1       |

(#1) In some cases, one category of bacteria has two species like *Ps. testis/alcaligenes*, and in other cases, only a gene name is given like *Pasteurella* spp. In both cases, each category is counted once.

(#2) In five groups, three groups are almost same as *Flavobacterium*, and two groups *Pseudomonas*.

(#3) In addition to five groups of API20E, *Alcaligenes*-like group and *Bordetella*-like group are added.

API20E, API20NEの2種類のグラム陰性桿菌用簡易同定システムを用いて同定を行った。

### 3.2 APIシステム

API20Eは腸内細菌を含むグラム陰性桿菌を、API20NEは非発酵のグラム陰性桿菌をそれぞれ対象とした簡易同定システムである。表2にその対象とする菌種を、表3の上段にシステムに含まれるテストを示す。それぞれ28、22のテスト項目からなり、テスト開始後24時間または48時間で各テストの判定を行い、各テストの+、-の組合せから、専用のプロファイルインデックスを索引のように使い、また、これに記載のないデータについては、コンピューターサービスにより、菌種の同定が行えるようになっている。両システムとも、医学細菌に関しては、APIテストとプロファイルインデックスを使った同定結果は、従来法による同定結果と90%以上の高率で一致している(Oberhofer(1979), 山中ら(1984))。

Table 3. List of characterizing tests

| Characterizing Test                                 | API20E                   | API20NE            |
|-----------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| $\beta$ -galactosidase                              | ONPG(1)                  | PNPG(37)           |
| $\beta$ -glucosidase                                |                          | ESC(35)            |
| Arginine dihydrolase                                | ADH(2)                   | ADH(33)            |
| Lysine decarboxylase                                | LDC(3)                   |                    |
| Ornithine decarboxylase                             | ODC(4)                   |                    |
| Utilization of citrate                              | CIT(5)                   |                    |
| $\text{H}_2\text{S}$ from thiosulfate               | $\text{H}_2\text{S}$ (8) |                    |
| Urease                                              | URE(7)                   | URE(34)            |
| Tryptophan desaminase                               | TDA(8)                   |                    |
| Indole from tryptophan                              | IND(9)                   | TRP(31)            |
| Voges Proskauer test                                | VP(10)                   |                    |
| Gelatin hydrolysis                                  | GEL(11)                  | GEL(38)            |
| Ferment./Oxi. of glucose                            | GLU(12)                  | GLU1(32)           |
| Ferment./Oxi. of mannitol                           | MAN(13)                  |                    |
| Ferment./Oxi. of inositol                           | INO(14)                  |                    |
| Ferment./Oxi. of sorbitol                           | SOR(15)                  |                    |
| Ferment./Oxi. of rhamnose                           | RHA(16)                  |                    |
| Ferment./Oxi. of sucrose                            | SAC(17)                  |                    |
| Ferment./Oxi. of melibiose                          | MEL(18)                  |                    |
| Ferment./Oxi. of amygdaline                         | AMY(19)                  |                    |
| Ferment./Oxi. of arabinose                          | ARA(20)                  |                    |
| Assimilation of glucose                             |                          | GLU2(38)           |
| Assimilation of arabinose                           |                          | ARA(39)            |
| Assimilation of mannose                             |                          | MNE(40)            |
| Assimilation of mannitol                            |                          | MAN(41)            |
| Assimilation of N-acetyl-glucosamine                |                          | NAG(42)            |
| Assimilation of maltose                             |                          | MAL(43)            |
| Assimilation of gluconate                           |                          | GNT(44)            |
| Assimilation of caprate                             |                          | CAP(45)            |
| Assimilation of adipate                             |                          | ADI(46)            |
| Assimilation of valate                              |                          | VAL(47)            |
| Assimilation of citrate                             |                          | CIT(48)            |
| Assimilation of phenyl-acetate                      |                          | PAC(49)            |
| Oxidase                                             | OXI(21)                  | OX(50)             |
| Nitrite from Nitrate                                | $\text{NO}_2$ (22)       | $\text{NO}_2$ (29) |
| Nitrogen gas from nitrate                           | $\text{N}_2$ (23)        | $\text{N}_2$ (30)  |
| Motility                                            | MOB(24)                  |                    |
| Growth on MacConkey agar                            | MCC(25)                  |                    |
| Oxidation                                           | OF/O(26)                 |                    |
| Fermentation                                        | OF/F(27)                 |                    |
| Catalase                                            | CAT(28)                  |                    |
| Colony diameter                                     | <1mm                     | (51)               |
| Colony diameter                                     | 1-2mm                    | (52)               |
| Colony diameter                                     | 3-4mm                    | (53)               |
| Colony diameter                                     | >5mm                     | (54)               |
| Colony color                                        | yellow                   | (55)               |
| Colony color                                        | white                    | (56)               |
| Colony color                                        | red                      | (57)               |
| Colony color                                        | cream                    | (58)               |
| Colony color                                        | yellow & cream           | (59)               |
| Colony color                                        | tolerant                 | (60)               |
| Colony color                                        | orange                   | (61)               |
| Colony appears first period                         |                          | (62)               |
| Colony appears second period                        |                          | (63)               |
| Colony appears third period                         |                          | (64)               |
| Colony appears fourth period                        |                          | (65)               |
| Colony appears fifth period                         |                          | (66)               |
| Polyphosphate staining                              |                          | (67)               |
| PNB staining: inside cell                           |                          | (68)               |
| PNB staining: outside cell                          |                          | (69)               |
| Coccus                                              |                          | (70)               |
| Filamentous                                         |                          | (71)               |
| Rod or bacillus                                     |                          | (72)               |
| Cell size: smaller diameter                         |                          | (73)               |
| Ratio of longer diameter to smaller diameter: 1     |                          | (74)               |
| Ratio of longer diameter to smaller diameter: 1.5-2 |                          | (75)               |
| Ratio of longer diameter to smaller diameter: 3-4   |                          | (76)               |
| Ratio of longer diameter to smaller diameter: >4    |                          | (77)               |

\* The numbers in the parentheses are the code numbers of characterizing tests for the cluster analysis.

### 3.3 単離した細菌の 同定結果

A 1 は、ML 引き抜き式でリン除去の良好なとき、A 2 は、ML 引き抜き式で、長期間良好なリン除去の見られなかったとき、B は、上澄み引き抜き式でリン除去の良好なときのサンプルである。適当なプレートから、A 1、A 2、B で、それぞれ、20、26、40 個のコロニーを釣菌した。VSS 当りの出現コロニー数は、それぞれ、 $5.6 \times 10^{10}$ 、 $5.6 \times 10^{10}$ 、 $1.0 \times 10^{11}$  個/g-VSS であった。A 2 はホモジナイズの方法が他の 2 つのサンプルと異なるが、ほぼ同程度の処理が行われたと考えられる。API テストの同定結果を表 4 に示す。A 1 は、植え継ぎの間に失われた 2 個を除くと、すべての細菌がグラム陰性の桿菌であった。これに対して、A 2 は糸状菌が、B は球菌が、それぞれ、他のサンプルに比較して多かった。また B は、植え継ぎの間に失われた細菌の割合が他の 2 つのサンプルに比べて多かった。API 20E の結果では、リン除去が良好なときのサンプル A 1、B には、Acinetobacter calcoaceticus var. lwoffii と同定されるものが多かったが、リン除去の良好でな

Table 4. Bacterial flora of activated sludge analyzed by use of API systems.

|                                                         | API 20 E                                                                                                                                                                                                                                                                                            | API 20 NE                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sample A 1                                              | Acinetobacter calco. var. lwoffii 10<br>Pseudomonas maltophilia 2<br>(L)Bordetella/Alcaligenes, Ps. 2<br>(D)A., Ps., Past. 1<br>(U)Ps., A., Past. 1<br>(U)Bord./Alcal., A., Past. 1<br>Unidentified 1                                                                                               | Pasteurella 5<br>Pseudomonas 2<br>Achromobacter group V D 1<br>Agrobacterium radiobacter 1<br>(D)A., Ps., Past. 3<br>(D)Ps., Flav. 1<br>(D)Ps., Alcal., Ps. 1<br>(U)A., Ps., Past. 1<br>(U)Ps., A. 1<br>(U)Ps., Achrom., Agro. 1<br>(U)Ps., Past., Flav. 1                         |
| Lost during experiments 2                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Total 20                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Sample B                                                | Acinetobacter calcoaceticus var. lwoffii 7<br>(L)Moraxella, Pasteurella 1<br>(L)A., Pasteurella 1<br>(L)Enterobacter, Serratia 1<br>(D)Pseudomonas, A. 3<br>(D)Past., Ps., Morax. 1<br>(D)A., Past., Morax. 1<br>(D)A., Past., Achrom. 1<br>(D)Ps., Past. 1<br>(U)Bord./Alcal., Morax., Ps. 1       | Achromobacter group V D 2<br>Pseudomonas 2<br>Pasteurella 2<br>CDC IV C-2 1<br>Agrobacterium radiobacter 1<br>Ac. calco. var. lwoffii 1<br>(D)A., Ps., Past. 4<br>(D)Agro., Ps. 1<br>(U)CDC IV C-2, Ps. 1<br>(U)Ps., Achrom., Ps. 1<br>(U)Vibrio, Past., Ples. 1<br>Unidentified 1 |
| Coccus 7<br>Filamentous 3<br>Lost during experiments 12 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Total 40                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Sample A 2                                              | Pasteurella spp 1<br>(D):A., Ps., Ac. anitratus 1<br>(D):Tatumella, Shigella, Ps. 1<br>(D):Past., Ps., Flav. 2<br>(U):Past. spp, A., Ps., or (D):Past., Ps., Past. 1<br>(U):Ps., Ps., Achrom. 3<br>Unidentified 2<br>Filamentous 9<br>Gram-positive rods 1<br>Coccus 3<br>Lost during experiments 2 | (L):Pasteurella, Flav. 2<br>(D):Aerom., Past., Achrom. 1<br>(D):Ps., Achrom., Ps. or (U):Ps., Achrom., Ps. 1<br>(D):Aerob., Past., Achrom. 3<br>(U):Achrom., Ps., Vibrio 1<br>(U):A., Achrom., Ps. 1                                                                               |
| Total 26                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

\* API20E is standardized identification system for Enterobacteriaceae and other Gram-negative rods, and API20NE is for Gram-negative rods not belonging to Enterobacteriaceae family.

\* (L):Low description, (D):Doutful, (U):Unacceptable

\* A.:Acinetobacter calcoaceticus var. lwoffii, Ac.:Acinetobacter  
 Ps.:Pseudomonas, Past.:Pasteurella, Agro.:Agrobacterium  
 Flav.:Flavobacterium, Achrom.:Achromobacter, Bord.:Bordetella  
 Alcal.:Alcaligenes, Morax.:Moraxella, Aerom.:Aeromonas  
 Aerob.:Aerobacter Ples.:Plesiomonas

かったA2には、なかった。API20EとAPI20NEとの結果を比べると、両者は必ずしも一致せず、むしろ異なる菌名が得られることがほとんどだった。

また、表中の(L),(D),(U)は、実験データが、それぞれ、"Low description", "Doutful", "Unacceptable"と判断されたもので、不明確な結果を表す。これらの記号のないものは、"Very good", "Good", "Acceptable"な結果である。表のデータから計算されるように、同定結果が不明確となった細菌数のAPIテストを行った全細菌数に対する割合は、それぞれ、8, 29, 15%, 合計で52%と半数を超えている。

### 3.4 細菌の同定結果に関して

リン除去の良好なときのサンプル(A1, B)で両テストの結果を比べると、API20Eでは、Acinetobacterと同定される細菌が多く、これは、Lotter(1985)その他の既往の研究に一致する。従って、API20Eで、Acinetobacterと同定される細菌が、嫌気好気式活性汚泥法で良好なリン除去の見られる場合の優占菌となっている可能性が高い。ただし、API20EでAcinetobacterと同定された細菌がAPI20NEでも"Acceptable"以上のレベルでAcinetobacterと同定された例はなく、嫌気好気式活性汚泥法のポリリン酸蓄積菌をAcinetobacterと結論づけることはできない。

サンプルBはサンプルA1と比較すると球菌が多かった。これには、反応槽A、Bの運転方式の違いが影響しているということも考えられる。

一般に、ポリリン酸は、Acinetobacterだけではなく、比較的多くの細菌により蓄積されることが知られている(Gerhard Gottschalk(1980))。Suresh(1985)らによれば、活性汚泥から単離した細菌の内Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter lwoffiiに加えてPseudomonas vesicularisもリンの放出、摂取を行なったとされる。また、Yeら(1988)はPseudomonas aeruginosaの保存菌株でリンの放出、摂取のあったことを報告している。リン除去の良好なときのAPI20NEの結果では、Pseudomonasも見られたが、この属の細菌が嫌気好気式活性汚泥法においてリンの放出、摂取を行っているということもあり得る。

長期間、リン除去が良好にならなかったときのサンプルA2は、他の2つのサンプルに比較して、API20Eで同定できたものが1つだけで、Acinetobacterと同定されるものがなかったこと、API20NEでは同定できたものがなかったことが特徴的であった。

また、API20Eのみを使用したBrodish(1985)の場合、サンプルによっては同定できなかった細菌もあるが、その割合は0-15%と少ない。他の例でも、同定できなかった細菌が多かったという記述は見あたらない。これに対して、今回の結果では、"Low description", "Doubtful", "Unacceptable"といった同定結果の不明確となった細菌が全体の52%と多かった。ここでは詳しいデータを示さなかったが、両システムの結果が一致しない場合が多かったことも合わせて考えると、活性汚泥細菌を対象としたAPIシステムのみによる同定には、問題があるといえよう。

### 3.5 クラスター分析

APIシステムのプロファイルインデックスが有効に利用できなかったため、Lighthart and Loew(1972)を参考にして細菌のクラスター分析を試みた。この際、データーは、API20E, API20NEの合計50項目の他に、コロニーの色、大きさ、ポリリン酸染色での染色性、PHB染色での染色性等、表3の下段のテスト項目を追加、合計77項目とした。ここでは、APIのテスト項目や、染色等のテストの中で、+、-の判定がはっきりしなかったものも含めて解析するために、+のものに1、-のものに0、はっきりしないものに0.5のデータを与え、Lighthart and Loew(1972)のJaccardの類似度の代わりに、非類似度の指標として重み付きのユークリッド距離を用いた。重み付けは、例えばコロニーの色の指標は、全体として他の指標1つと同じ重みとなるように行った。クラスター間の非類似

度の計算の方法には、最短距離法、最長距離法、群平均法、重心法、メジアン法、ウオード法の6通りを試みた。これらは、例えば、最短距離法は、2つのクラスターに含まれる要素のうち距離の一番近い要素間の距離を、最長距離法は、同じく距離の一番遠い要素間の距離を指標とするもので、ウオード法は、クラスター内の要素間の距離の平方和が最小になるようにクラスターを作っていくものである。実際の計算には、主に、脳本ら(1986)のソフトを利用し、パソコンを用いた。ここで用いたAPIテストは、球菌、糸状菌を対象としていないが、今回は、一部の単離した球菌、糸状菌についてもAPIテストを行った。また、サンプルA2については、表1⑥の培地以外に、Nutrient Broth (Difco)10% + 寒天 1.5%、Trypticase Soy Agar(BBL) 10% + 寒天 1.35% の2種の培地を用いて単離した細菌についてのデータがある。クラスター分析の際には、データ数を増やす目的でこれらのデータも使用し、合計99の単離菌のデータについて分析した。

### 3.6 クラスター分析の結果

表5にクラスター数を10としたときの各方法での結果を示す。表のかっこ内の数は、各クラスターに含まれる細菌数である。この数には、球菌、糸状菌、および、サンプルA2の他の寒天培地を用いて単離した細菌も含まれている。また、1つのコロニー由来の細菌について、コロニーの様子が異なる等の理由により2回以上テストしたものがあり、それらが同じクラスターに分類されたときには1つの同じ細菌として扱った。各方法で縦横の細菌数の合計が合わないものがあるのは、これらの理由による。ここで用いた6つの方法のうち、ウオード法を除く5つの方法では細菌数1つのクラスターが多く発生し、また、1つないしは2つのクラスターに固まる傾向を示した。最短距離法、重心法、メジアン法では、A1, A2, Bの全てのサンプルが同じ様な細菌分布を示した。これに対して、最長距離法、群平均法、ウオード法によるとリン除去の良好なときのA1, Bはほぼ同様な細菌分布を示し、リン除去の良好でないときのA2の細菌分布は他と異なっている。中でもウオード法にこの傾向が強い。したがって、ここではウオード法を採用し、以下にその結果を述べる。

Table 5. Results of cluster analysis(\*).

| Nearest Neighbor Method |    |    |    | Furthest Neighbor Method |    |    |    |
|-------------------------|----|----|----|--------------------------|----|----|----|
|                         | A1 | A2 | B  |                          | A1 | A2 | B  |
| 1 (74)                  | 16 | 4  | 20 | 1 (4)                    | 3  |    |    |
| 2 (2)                   | 1  |    |    | 2 (44)                   | 10 | 3  | 13 |
| 3 (11)                  |    | 3  |    | 3 (5)                    | 1  |    | 2  |
| 4 (5)                   | 1  |    | 2  | 4 (5)                    |    |    | 1  |
| 5 (2)                   |    |    | 1  | 5 (10)                   |    | 4  |    |
| 6 (1)                   |    |    |    | 6 (27)                   | 4  | 1  | 7  |
| 7 (1)                   |    |    |    | 7 (1)                    |    |    | 1  |
| 8 (1)                   |    |    | 1  | 8 (1)                    |    |    |    |
| 9 (1)                   |    |    |    | 9 (1)                    |    |    | 1  |
| 10 (1)                  |    |    | 1  | 10 (1)                   |    |    |    |

| Centroid Method |    |    |    | Median Method |    |    |    |
|-----------------|----|----|----|---------------|----|----|----|
|                 | A1 | A2 | B  |               | A1 | A2 | B  |
| 1 (57)          | 12 | 7  | 13 | 1 (87)        | 16 | 6  | 20 |
| 2 (1)           |    |    |    | 2 (2)         |    |    | 1  |
| 3 (32)          | 5  | 1  | 9  | 3 (1)         | 1  |    |    |
| 4 (2)           |    |    | 1  | 4 (2)         |    |    | 1  |
| 5 (2)           | 1  |    |    | 5 (2)         | 1  |    | 1  |
| 6 (1)           |    |    |    | 6 (1)         |    |    |    |
| 7 (1)           |    |    |    | 7 (1)         |    |    |    |
| 8 (1)           |    |    | 1  | 8 (1)         |    |    | 1  |
| 9 (1)           |    |    | 1  | 9 (1)         |    |    |    |
| 10 (1)          |    |    |    | 10 (1)        |    |    | 1  |

| Group Average Method |    |    |    | Ward Method |    |    |    |
|----------------------|----|----|----|-------------|----|----|----|
|                      | A1 | A2 | B  |             | A1 | A2 | B  |
| 1 (45)               | 13 | 2  | 13 | 1 (31)      | 12 |    | 11 |
| 2 (1)                |    |    |    | 2 (3)       | 1  |    | 1  |
| 3 (3)                |    |    | 1  | 3 (12)      |    | 2  |    |
| 4 (11)               |    | 4  |    | 4 (11)      |    | 4  |    |
| 5 (30)               | 4  | 1  | 7  | 5 (21)      | 4  |    | 7  |
| 6 (5)                | 1  |    | 4  | 6 (6)       |    |    | 1  |
| 7 (1)                |    |    | 1  | 7 (6)       |    | 1  |    |
| 8 (1)                |    |    |    | 8 (5)       | 1  |    | 2  |
| 9 (1)                |    |    | 1  | 9 (3)       |    |    | 1  |
| 10 (1)               |    |    |    | 10 (1)      |    |    |    |

\* The numbers in this table indicate the numbers of bacteria of the samples (A1, A2, B) which belong to the clusters(1-10).

The numbers in the parentheses are the total numbers of the bacteria belong to the clusters.

ウオード法では、リン除去が良好なときのサンプルであるA1、Bでは、クラスター1、5に含まれる細菌が多かった。これに対して、A2では、クラスター3、4に含まれる細菌が多かった。API 20Eで *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii* と同定された細菌は、クラスター1、5、8にそれぞれ、10、6、1個ずつ含まれた。主なクラスターの共通の性質は、以下の通りである。

クラスター1 (31) (カッコ内の数字はクラスターに含まれる細菌数を示す。) は、API 20Eでは、Voges Proskauerテスト (以下VPテストと略す) が不定で、その他の項目は陰性、API 20NEの項目は、硝酸の亜硝酸への還元、が不定で、その他の項目は陰性である。コロニーの色はクリーム色である。クラスター5 (21) は、API 20Eの項目は、VPテスト、硝酸の窒素ガスへの還元、マッコンキー寒天上での増殖、カタラーゼが不定、その他は陰性である。API 20NEの項目は、硝酸の亜硝酸への還元、 $\beta$ -グルコシダーゼが不定、グルコース、アラビノース、マンノース、マンニトール、Nアセチルグルコサミン、マルトース、グルコン酸、アジピン酸、リンゴ酸、クエン酸の利用性が陽性、その他は陰性である。コロニーの色はクリーム色である。クラスター3 (12) は、API 20Eの項目は、VPテスト、ゼラチンの加水分解、OFテストの酸化、還元、カタラーゼが不定の他は、すべて陰性、API 20NEの項目は、すべて陰性である。クラスター4 (11) は、マッコンキー寒天上での増殖、OFテストの酸化、還元、カタラーゼが陽性、オルニチン脱炭酸酵素、クエン酸の利用性、VPテスト、硝酸の亜硝酸、窒素ガスへの還元、運動性が不定で、その他は、陰性である。API 20NEの項目は、Nアセチルグルコサミンの利用性が陽性、硝酸の亜硝酸への還元、 $\beta$ -グルコシダーゼが不定、さらに、アラビノース、マンノース、マンニトール、マルトースの利用性が不定で、その他は陰性である。

以上に述べたテストの内、VPテストは、腸内細菌、およびBacillus属の同定で重要な指標となるもので、グルコースからのアセトイン生成の有無を判定する。API 20Eでは、反応時間の短縮を目的としてビルビン酸を基質としている。また、OFテストは、グルコースからの好氣的、および嫌氣的な酸生成の有無を判定するものである。例えば、Pseudomonas属は好氣的に、腸内細菌は好氣のおよび嫌氣的に、酸を生成する。

### 3.7 クラスター分析の結果に関して

上で見たように、API 20E、API 20NEの同定結果だけでは不明確な細菌数が多く、また、両者の結果の一致しないことが多かったため、各サンプルの特徴を示すには不充分であった。このような場合、得られたデータを有効に使用してサンプル中の細菌をグループ分けする方法として、クラスター分析が有効であろう。ここで用いた6つの方法の内、最長距離法、群平均法、ウオード法の3つの方法で、特にウオード法によって、リン除去の良否によって細菌の分布を分けることができた。ウオード法の場合、リン除去の良好なサンプルでは、クラスター1、5に含まれる細菌が多かったのに対して、長期間良好なリン除去の見られなかったサンプルでは、クラスター3、4に含まれる細菌が多かった。このことから、嫌気好気式活性汚泥法でリン除去が良好な場合には、クラスター1、5に含まれる細菌が多いということが言える。これらのクラスターが細菌学的に見てどのような性質の細菌を含んでいるのか等については、今後、更に検討していきたい。

## 4. まとめ

嫌気好気式活性汚泥法の、ML引き抜き式と上澄み引き抜き式での挙動、および、細菌相に関する実験的検討を行い、次のような知見が得られた。

- ① 回分式の嫌気好気式活性汚泥法で、上澄み引き抜き式からML引き抜き式に変更した場合、リン除去は悪化したが、ML引き抜き式の運転を続けると良好なリン除去を示すこともある。これは、嫌気好気式活性汚泥法を単離菌の純粋培養、または、混合培養により再現する際に、重要な点である。こ

のとき、塩濃度、水温の影響のあることが示唆された。

- ② リン除去の良好なときには、API 20Eで Acinetobacter と同定される細菌が多かった。これに対して、長期間、リン除去の良好にならなかった系のサンプル中には、API 20Eで Acinetobacter と同定される細菌はいなかった。これらのことから、API 20Eで Acinetobacter と同定される細菌が嫌気好気式活性汚泥法で重要な役割をしていることが示唆された。

また、API システムの同定結果の不明確となった細菌が多かったこと、API 20EとAPI 20NEとで同定結果の一致しないことが多かったことから、API システムだけで活性汚泥細菌を同定することには問題があると考ええる。

- ③ クラスタ分析の6つの方法の中で、最長距離法、群平均法、ウォード法を用いた場合に、リン除去の良好なときの汚泥と長期間リン除去が良好にならない汚泥の細菌分布を分けることができた。クラスタ分析は、今回のように、API システムだけでは同定結果が不明確となる細菌が多い場合に、そのデータを活用するための有効な方法である。

なお本報の一部は第43回土木学会年次講演会(1988年10月)で発表した。

#### 謝辞

本研究の一部は、現東京都下水道局(前文部技官)浅見恵一氏にお手伝い頂いた。ここに記して謝意を表したい。

#### 参考文献

アスカ純葉 "API 20Eプロファイルインデックス"

アスカ純葉 "API 20NEプロファイルインデックス"

Brodisch, K.E.U. (1985): Interaction of different groups of microorganisms in biological phosphate removal, Wat. Sci. Tech., 17(11/12), 121-130, Paris

Deinema, M.H., Loosdrecht, M.V., Scholten, A. (1985): Some Physiological Characteristics of Acinetobacter spp. Accumulating Large Amounts of Phosphorus., Wat. Sci. Tech., 17(11/12), 153-160, Paris

Fukase, T., Shibata, M., Miyaji, Y. (1984): The Role of Anaerobic Stage on Biological Phosphorus Removal, Wat. Sci. Tech., 17(2/3), 69-80, Amsterdam

Fuhs, G.W., Chen, M. (1975): Microbiological basis of Phosphate Removal in the Activated Sludge Process for the Treatment of Wastewater., Microbial Ecology, 2, 119-138

Gerhard Gottschalk (善養寺浩 監訳(1980)): 細菌の代謝、p.126、近代出版

Lighthart, B., Loew, G.A. (1972): Identification Key for Bacteria Clusters from an Activated Sludge Plant, J. Wat. Poll. Cont. Fed., 44, 2078-2085

Lotter, L.H. (1985): The Role of Bacterial Phosphate Metabolism in Enhanced Phosphorus Removal from the Activated Sludge Process., Wat. Sci. Tech., 17(11/12), 127-138, Paris

松尾吉高、細洞克巳(1988): 嫌気好気活性汚泥法の実験的研究ーリン酸摂取反応特性の検討、第3回 WPCF/JSWA合同下水道技術セミナー講演要旨集、33-56、東京

Mino, T., Kawakami, T., Matsuo, T. (1984): Location of Phosphorus in Activated Sludge and Function of Intracellular Polyphosphates in Biological Phosphorus Removal Process., Wat. Sci. Tech., 17(2/3), 93-106, Paris

Miya, M., Kitagawa, M., Matsuo, Y. (1984): Sludge Phosphorus Fractionation and Itemization of

- Roules of Phosphate Removal Augmented by Anaerobic Aerobic Process., Newsletter of Study Group on Phosphate Removal in Biological Sewage Treatment Processes, 2
- 中村和憲、三上栄一、鈴木智雄、増田和成(1988)：リン蓄積細菌の分離および培養、第22回水質汚濁学会講演集, 131-132, 東京
- Oberhofer, T. H. (1979) :Comparison of the API20E and Oxi/Ferm System in Identification of Nonfermentative and Oxidase-Positive Fermentative Bacteria, J. of Clinical Microbiology, 9, 220-226
- Suresh, N., Warburg, R., Timmerman, M., Wells, J., Coccia, M., Roberts, M. F., Halvorson, H. O. (1985) :New strategies for the isolation of microorganisms responsible for phosphate accumulation Wat. Sci. Tech., 17(11/12), 131-144, Paris
- 都筑良明、味埜俊、松尾友矩(1986)：純粹培養系による嫌気好気法のリン除去現象の再現に関する基礎的研究－固液分離をしない系でのリン除去、土木学会第41回年次学術講演会、福岡
- Tsuzuki, Y., Mino, T., Matsuo, T. (1987): Effect of low dilution rate on phosphorus removal in the fill-and-draw anaerobic-aerobic process. in Biological Phosphorus Removal from Wastewaters (Ed. Ramadori, R.), 325-328, Pergamon Press
- Van Groenestijn, J. W., Deinema, M. H. (1987): The utilization of polyphosphate as an energy reserve in *Acinetobacter* sp. and activated sludge. in Biological Phosphate Removal from Wastewaters (Ed. Ramadori, R.), 1-6, Pergamon Press
- 山中喜代治、三好典子、藪内英子(1984)：非発酵グラム陰性桿菌28菌種1グループ204株を用いたAPI20NEの評価、臨床と細菌、11、513-527
- Ye, Q., Ohtake, H., Toda, K. (1988): Phosphorus Removal by Pure Culture and Mixed Cultures of Microorganisms., J. Ferment. Tech., 66(2), 207-212
- 脇本和昌、垂水共之、田中豊編 (1986)：パソコン統計解析ハンドブックⅠ、Ⅱ、共立出版