

活性汚泥の培養方法がその微生物相に及ぼす影響

都立大学工学部

生 方 悠

活性汚泥処理実験を室内で行なう場合、種汚泥となる活性汚泥を採取した季節や培養有機物の種類により、活性汚泥中の微生物相が大きく変化するとの実験結果が得られた。この知見は今後の活性汚泥による有機物の処理機構を解明する上でも重要な事項と考えられるのでここに報告する。

1. 実験方法

活性汚泥処理場返送汚泥を種々の有機物を用いて回分法により長期間培養した。有機物負荷は 0.2g/g SS/D とし、有機物は粉状のまま培養槽に添加した。週に 2-3 回曝気を停止し活性汚泥を沈澱させ、微量金属を補給するため活性汚泥を水道水で数回洗浄した。無機塩としては BOD 測定用の補強液を添加し、また糖類の場合には塩化アンモニウムも適宜添加した。活性汚泥の培養、基質の除去速度及び基質独立性指標の測定方法・その他は筆者の方法による¹⁾。活性汚泥中のポリグルコースは 30% KOH を用いて 100°C、2 時間で抽出し、その後終濃度で 60% になるようエタノールを添加し、沈澱物をアンスロン法で測定した。

2. 実験結果および考察

2-1 ペプトン培養活性汚泥

A 活性汚泥は 2 月上旬に芝浦処理場返送汚泥を採取し、B 活性汚泥は A 汚泥を冷凍庫 (-30°C) に 1 年間保存し解凍後、また C 活性汚泥は 5 月上旬に芝浦処理場返送汚泥を採取し、各々ペプトンで培養した。

A 汚泥による基質の除去速度と基質独立性指標については既に報告されている^{1, 2, 3)}。表-1 に示すように必須アミノ酸間の基質独立性指標 (S I I) は 85-95% と割合高い値が得られている。一方この活性汚泥によるグルタミン酸、酢酸、グルコース (酢酸、グルコースはペプトン中には存在しない有機物である) 間の S I I は 94-97% を示しており、混合基質の除去においては各々の基質除去の重ね合わせが完全ではないがほぼ成立していた³⁾。このようにこれらの性格の異なる有機物間の S I I は必須アミノ酸間のそれより高い値が得られている。

B 汚泥による各アミノ酸の除去速度にはあまり差がなく、またペプトンの除去はほぼ直線的に除去されていた (A 汚泥の場合には 1 次反応)。表-1 に示すように B および C 汚泥による必須アミノ酸間の S I I は、C 汚泥の Leu-Lys 間の 98% を除き、すべて 80% 以下を示していた。特に、Phe-Leu 間の S I I は両汚泥とも 60% 以下で示されているように、このアミノ酸混合物の除去速度は単独のアミノ酸の除去速度とほとんど同じであった。B・C 汚泥を鏡したところ、B 汚泥には糸状菌 (カビ) が多量に存在しており、また C 汚泥では活性汚泥の表面は細菌で覆われていたが、カバーガラスで活性汚泥を押し潰したところ、内部には多量の酵母が存在していた (都立大学・理学部・生物学教室・微生物生態学講座、滝井助教も確認している)。なお B・C 汚泥の培養槽壁面には A 活性汚泥に較べ多量の活性汚泥が付着していた。

大腸菌や *Pseudomonas* などの原核生物 (細菌) におけるアミノ酸の輸送系は各アミノ酸に対する基質特異性が強く、ほとんどのアミノ酸は別個の輸送系で細胞内に取り込まれている⁴⁾。これに対して糸状菌や酵母などの真核生物におけるアミノ酸の輸送系は特定のアミノ酸を選択的に輸送するのではなく同一の輸送系でほとんどのアミノ酸を細胞内に取り込んでいる⁴⁾。ところがグルコースやマルトースなどの糖類および酢酸や TCA 回路中間体などの有機酸は、真核および原核生物

表-1 基質独立性指標 (S I I, %)

基質混合物	活性汚泥		
	A	B	C
Phe - Leu	96	55	57
Phe - Lys	85	80	78
Leu - Lys	92	66	98
Arg - Phe	88	77	
Arg - Lys		65	58

に関係なく全ての微生物において特異的な輸送系により細胞内に取り込まれる⁵⁾。

これらのことから、B・C汚泥において必須アミノ酸間のS I Iが低い値であることはペプトン中のアミノ酸を取り込む微生物は糸状菌や酵母などの真核生物によるものと考えられる。A汚泥においてグルタミン酸、酢酸、グルコース間のS I Iは高い値であるのに、必須アミノ酸間のS I Iがやや低い値を取るのはその活性汚泥中には糸状菌や酵母などの真核生物がある程度存在していることに原因があるものと考えられる。

同一処理場の活性汚泥をペプトンで培養した場合、活性汚泥の採取時期により培養活性汚泥中の微生物相が大きく変化すると結果が得られた。水温が上昇して来ると酵母の活動が細菌より活発になるからであろう。細菌を主体とした活性汚泥を得るには冬季の処理場活性汚泥を培養した方が良からう。筆者の研究は好運に恵まれながら開始することが出来たようである^{1)・2)・3)}。もし5月に活性汚泥の培養を開始していたなら、(その後も春から夏にかけて数度の培養結果でもC汚泥と同様であった)酵母が優占してしまうので、アミノ酸を用いての下水処理機構の解析は不可能であったと考えられる。

2-2 糖類系活性汚泥

D・G・H活性汚泥は日大・松島氏、某国立大学、微工研・中村氏から各々譲渡されたもので、恒温室では糖類：ペプトン=4:1で培養した汚泥である。D活性汚泥は落合処理場活性汚泥を1級グルコース：尿素=4:1で培養したもので、SRT=20D以上である。G・H活性汚泥は都市下水処理場活性汚泥と由来不明の活性汚泥を特級グルコース：ペプトン=1:1で培養していたものである。E・F活性汚泥は、芝浦処理場返送汚泥をデキストリンないし薬局方グルコースで糖類：ペプトン=4:1で培養したものである。デキストリンは加水分解されマルトースなどのオリゴ糖として活性汚泥に取り込まれており、デキストリンのオリゴ糖への加水分解の過程がこの有機物除去における律速段階となっている⁶⁾。E活性汚泥の実験に限り基質としてマルトースを、また他の汚泥の実験基質にはグルコースを用いた。これらの基質を用いた実験結果を表-2に示す。またE・G活性汚泥を用いて、初期活性汚泥および基質濃度 600-700 mg/l、400mg/lにおける溶液中基質濃度を TOC 計およびアンスロン反応試薬による測定結果を図-1に示す。

E汚泥の場合には、溶液中基質濃度は TOC 値とアンスロン反応物濃度が一致していた。初期の基質および活性汚泥濃度を2倍以上にした場合でも同じ結果が得られた。G・H活性汚泥の場合には溶液中に TOC で測定されるがアンスロン試薬に反応しない物質(以下中間代謝産物と呼ぶ)が TOC 値で 24mg/l(初期基質濃度の16%)も検出された。この中間代謝産物量は北尾らの報告した値ともほぼ一致している⁷⁾。初期基質濃度を上げた場合、中間代謝物濃度は処理時間を経るにしたがい直線的に増加しており、また初期汚泥濃度を数段階に変化させた場合、一定の処理時間後における中間代謝産物濃度は初期活性汚泥濃度にはほぼ比例していた。F汚泥の場合中間代謝産物は時間を経ると増加しているものの検出量は少なかった。

E汚泥の場合には除去マルトース当り 20% のポリグルコースが活性汚泥内に存在していた。単位活性汚泥当りのポリグルコース含有量は実験前後で大きな変化はみられない。処理時間も4時間と長いことを考慮すると、この活性汚泥でのポリグルコースの存在は活性汚泥の細胞構成成分と判断して良からう。活性汚泥内グルコース量は測定していないが、活性汚泥の増加量から判断して低分子の糖が細胞内(ペリプラズム)に

表-2 種々の活性汚泥によるポリグルコースの貯蔵

汚泥	1	MLSS*				ポリグルコース*				ポリグルコース 単位汚泥当り(mg/g)				
		前	後	増加	2*	前	後	増加	3	前	後	基質	4	5
D	5.5	1220	1840	620	660	173	310	137	21	14.2	16.8	G1	39	30-40
E	4.0	1040	1590	550	700	151	288	137	20	14.5	18.1	G2	67	110-130
F	4.0	990	1550	560	700	137	323	186	27	13.8	20.8	G1	71	50-60
G	1.5	1100	1620	520	600	47	328	281	47	4.3	20.2	G1	145	15-20
H	3.0	1090	1620	530	600	130	468	338	56	11.9	28.9	G1	129	---

1：処理時間(h)、2：基質除去量、3：基質除去量に対するポリグルコースの割合(%)、4：基質の除去速度(TOCmg/gSS/h)、5：グルコースに対するオリゴ糖の除去速度(%)、*:(mg/l)

蓄積しているものと考えられる⁶⁾。一方 G・H 汚泥の場合には除去グルコース当り約 50% のポリグルコースが活性汚泥内に存在していた。単位活性汚泥当りのポリグルコース含有量は実験前後で 2.5-5.0 倍と大きな変化が見られているので、このポリグルコースは細胞内貯蔵物質と判断して良からう。

滝井は、ポリグルコースを貯蔵する通性嫌気性・グラム染色ポジティブの細菌を純粋培養し、この細菌はポリグルコース貯蔵時に酢酸などの有機酸を生成することを報告している⁸⁾。このことから G・H 活性汚泥はポリグルコースを貯蔵していることがより明かであろう。なお滝井は、有機酸を取り込む細菌も同時に分離培養し、グルコースを取り込む細菌とその細菌を混合するとグルコースの除去速度が上昇し、有機酸の生成に伴う pH の低下も起こらず、更に 1 日後には両細菌がフロックを形成することを見ている。

グルコースを細菌が取り込む場合、通性嫌気性細菌の *E. coli* などにはリン酸化分子転送で、また絶対好気性細菌の *Pseudomonas* などは能動輸送系を用いている⁹⁾。したがって貯蔵物質が細胞内の浸透圧に影響を与えないようにするには、リン酸化分子転送の場合には細胞質に高分子物質を、また能動輸送の場合にはペリプラズムに低分子物質を貯蔵することになる。D 汚泥は培養条件が他のものとは若干異なることに原因があるのかも知れないが、E 汚泥と同様にグルコース除去時にポリグルコースが貯蔵されてないものと考えられる。処理場から活性汚泥を採取したときにポリグルコースを貯蔵する細菌が存在していなかったのであろう。D 汚泥も E 汚泥と同様にグルコース除去時に低分子の糖を貯蔵していることになる。

薬局方グルコースにはオリゴ糖が含まれているらしく、F 汚泥ではグルコースに対するオリゴ糖の相対除去速度は 50-60% と他の汚泥のそれより高い値を示していた。F 汚泥における除去グルコース量に対するポリグルコース量は E 活性汚泥よりやや高く、また中間代謝産物生成量は H・G 汚泥のそれに対して 20% 程度と低い値が得られている。F 汚泥におけるポリグルコースを貯蔵する細菌の割合は、低分子の糖を貯蔵する細菌より少ないものと考えられる。

3. 結論

処理場活性汚泥をペプトンで培養したところ、冬季に採取した汚泥では細菌が、また春から夏にかけて採取した汚泥では酵母を主体とする活性汚泥が得られた。糖類で活性汚泥を培養した場合、デキストリン培養では細胞内にオリゴ糖を貯蔵し中間代謝産物を生成しない細菌が、またグルコース培養では細胞内にポリグルコースを貯蔵し酢酸などの有機酸を生成する細菌が主体となっていた。実際の処理場では曝気槽流入水においても有機物はコロイドないし浮遊性の高分子化合物であるので、処理場における有機物の代謝機構を解明したり、また処理場運転管理の手法を確立させる場合にも、培養有機物をグルコース¹⁰⁾で代用することは余りにも危険である。活性汚泥の培養基質にはせめてコロイド物質を使用すべきである。筆者は以前スキムミルク培養活性汚泥では基質除去に関与している微生物は糸状菌であると報告した¹¹⁾。低分子の糖類で活性汚泥を培養すると通常ではそれほど優占的でない微生物が優占して来るので注意すべきである。

<参考文献>

- 1) 生方(1991):第27回衛生工学研究論文集、土木学会
- 2) 生方(1988):第24回衛生工学研究論文集、土木学会
- 3) 生方(1989):第25回衛生工学研究論文集、土木学会
- 4) 安楽(1985):新医科学体系、第2A巻、P43-、中山書店
- 5) J.Monod(1947):Growth, Vol.11, p223-
- 6) 生方(1990):第45回年次学術講演会概要集第2部、p1044-
- 7) 岩井他(1968):土木学会論文集、No.159, p40-
- 8) 滝井(1980):微生物の生態 10、p171-、学会出版センター
- 9) 高橋他訳(1978):微生物学(上)、10章、p330-、培風館
- 10) A.F.Gaudy,Jr.(1985):J. WPCF., Vol. 57, No.4, p332-
- 11) 生方(1975):50年度発酵工学会大会講演要旨集、p120-

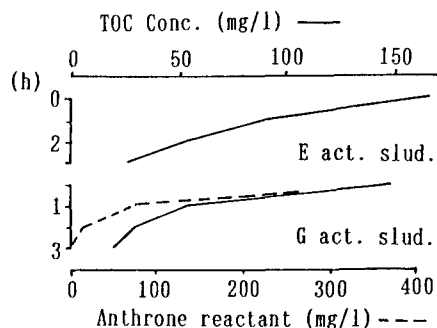


Fig. 1 Change of substrate conc.