

B-22 バチルス菌優占化活性汚泥反応槽でのバチルス菌と糞便性大腸菌の挙動

○生方 明日香^{1*}・荻野 修大¹・宮里 直樹¹・青井 透¹

¹群馬工業高等専門学校・専攻科環境工学専攻（〒371-0845群馬県前橋市鳥羽町580）

*E-mail: aoi@cvt.gunma-ct.ac.jp

1. はじめに

近年、し尿処理の分野で、ミネラル分を定期的に投入することで、曝気槽内に*Bacillus subtilis*を優占化させ、処理場の発生臭気を抑制し、余剰汚泥の発生率を低減させることにより、作業環境の改善と維持管理費の低減が期待できる新しい運転方法(新活性汚泥法とも呼ばれる)が普及しつつあり、海外にも技術移転されて稼働している¹⁾。この技術は長野県伊那中央衛生センターで最初に適用されたが、現在は群馬県内でもこの技術が導入されて、複数のし尿処理施設でバチルス優占化運転がなされていることは確認されている²⁾。

実際にバチルス菌優占化を行った処理施設では、処理水中の大腸菌数が低減し、塩素消毒をしなくても大腸菌<3000個/mgが達成できていると語られる処理施設がある。*Bacillus subtilis*は強力な抗菌物質(iturin A)を生産する³⁾とされており、この抗菌物質により大腸菌が抑制されていることが考えられるため、実際に群馬県内の各し尿処理活性汚泥・下水処理活性汚泥を採取し、バチルスコロニー数および糞便性大腸菌数数を測定したので、それらの挙動について報告する。

2. 調査対象施設および調査方法

(1) 調査対象施設

群馬県内のし尿処理施設のうち18カ所の反応槽混合液を採取し、活性汚泥中の大腸菌数・大腸菌群数・バチルスコロニー数と、処理水水質を測定した。調査を実施したし尿処理施設の一覧を表-1に示した。ここで、高負荷とは、ほぼ無希釈でMLSSを高く取ったコンパクトな処理方式である。標脱(標準脱窒素処理)とは、5~10倍程度に希釈して嫌気槽で窒素除去する方式である。好気とは、10日間以上の長い滞留時間で酸化分解し、さらに活性汚泥法で処理する方式であり、好希釈とは、好気性処理において、し尿を大量の水で希釈する方式である。各施設の処理能力をkg/日で示したが、この値は建設時のものであり、現状を示した値ではない。

表-1 大腸菌・バチルス菌同時測定を実施したし尿処理施設一覧

施設	処理対象物	汚水処理	汚泥	kl/日	開始年度	採水日	
A	し尿	高負荷	膜 乾燥	33	1998	9月6日	
B	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	膜 乾燥	35	2000	9月10日
C	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	焼却	71	1997	9月10日
D	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	焼却	174	1993	9月10日
E	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	焼却	29	1995	9月13日
F	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	焼却	112	1996	9月14日
G	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	焼却	50	1985	9月14日
H	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	膜 焼却	46	1991	9月14日
I	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	膜 焼却	206	1965	9月14日
J	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	焼却	20	1992	9月14日
K	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	乾燥	40	1983	9月15日
L	し尿	浄化槽汚泥	高負荷	焼却	62	1995	9月15日
M	浄化槽汚泥	好希釈	乾燥	87	1987	9月6日	
N	し尿	浄化槽汚泥	好気	焼却	75	1978	9月13日
O	し尿	浄化槽汚泥	標脱	乾燥	90	1982	9月13日
P	し尿	浄化槽汚泥	標脱	焼却	120	1995	9月14日
Q	し尿	浄化槽汚泥	標脱	焼却	100	1984	9月14日
R	し尿	浄化槽汚泥	標脱	焼却	94	1983	9月15日

(2) バチルス菌の測定方法

ニュートリエントブロス(Oxid-CM-1)0.8%、グルコース0.8%、塩化ナトリウム0.6%、寒天1.7%、水溶性デンプン1.0%を精製水に投入して加熱溶解後、この液体培地をオートクレーブにて滅菌し、これをシャーレに各20ml注入して冷蔵庫で2日間以上保管し、寒天平板培地(以下、培地と記す)を作成した。次に、ハンドホモジナイザーで20秒間攪拌した試料水を、滅菌した生理食塩水(0.85%塩化ナトリウム溶液)で希釈していき、 10^3 、 10^4 、 10^5 倍の希釈試料水を作った。培地に希釈試料水を0.1ml滴下し表面に均等に塗り広げ、1つの希釈試料水に対して2枚ずつ培地を作成し、48時間培養後に培地上に現れたコロニーを観察した。本来は恒温槽で30℃に保つが、今夏の猛暑により室温が高く、実際には35℃前後の高い温度となってしまった。培地上に現れたコロニーの一例を写真-1に示した。

バチルス属細菌のコロニー形状と種名の関係は、東京農工大学工学部細見研究室でのDNA解析により現在明らかになっており、この一例を写真-2に示した。これは本研

研究室で単離したコロニーを、細見研究室で「16srRNA解析の系統樹を示してこのあたりの位置にいる種」という分析をしていただき、作成したものである。この区分に基づき、バチルス菌のコロニー数とその他の菌のコロニー数を測定した。

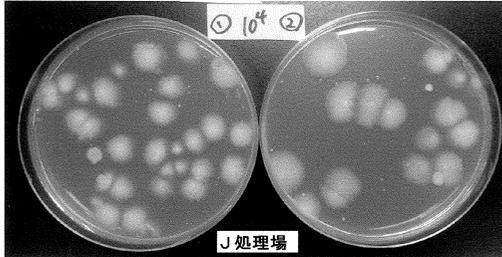


写真-1 培地上に現れたコロニーの一例

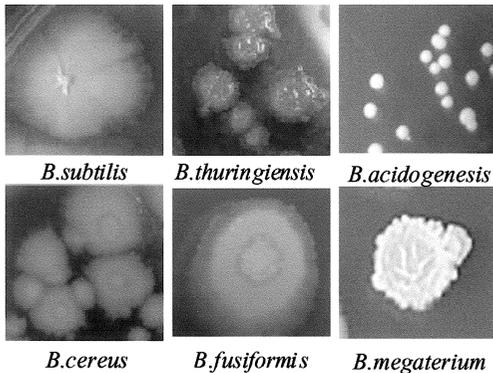


写真-2 バチルスコロニーの形状及び種名

(3) 大腸菌・大腸菌群の測定方法

大腸菌試験、大腸菌群試験は下水試験方法(1997年度版)の特定酵素基質培地法⁴⁾に準拠して測定を行ない各細菌数を求めた。今回、基質培地はピルビン酸添加XGal-MUG培地(塩化ナトリウム5.0g、硝酸カリウム1.0g、リン酸一水素カリウム4.0g、リン酸二水素カリウム1.0g、ラウリル硫酸ナトリウム0.10g、ピルビン酸ナトリウム1.0g、ペプトン5.0g、MUG0.10g、XGal0.10g、IPTP0.10gを無菌的に混合したもの)である、栄研化学株式会社のESコリプルー培地を使用した。培地を試験管に4.5ml注入し滅菌後、生理食塩水で希釈した試料水を、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 倍となるよう、培地に各倍率5本ずつ、0.5ml接種し、 37°C で24時間培養後に培地の変色を観察した。培地が青色に着色したことで大腸菌群陽性と判定した。培地の着色の一例を写真-3に示した。また、培地に紫外線ライトを当て蛍光の有無で大腸菌陽性と判定した。培地の蛍光の一例を写真-4に示した。これらの反応が起こった培地の数を測定し、最確数法により各細菌数を算出した。

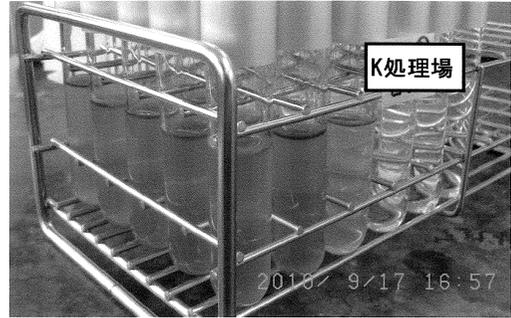


写真-3 培地の着色の一例(紫外線ライトなし)

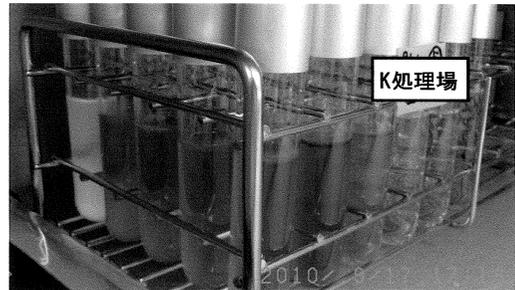


写真-4 培地の蛍光の一例(紫外線ライトあり)

(4) 処理水水質の測定方法

pH、EC、Clは携帯用測定器を用いて測定した。各態N、Pの測定にはオートアナライザーを使用した。

3. 調査結果および考察

(1) 大腸菌群数・大腸菌数・バチルスコロニー数

各し尿処理施設の反応槽混合液から得られた大腸菌群数・大腸菌数・バチルスコロニー数を、菌体1gあたりの個数として算出し、測定値の一覧を表-2に示した。参考として、県内のOD特選下水処理施設(Y施設)の大腸菌数・バチルスコロニー数⁵⁾も表中に示した。このY処理施設においてはバチルス菌・大腸菌数ともに週1回の測定を3ヶ月以上継続したので、平均値として示したが、大腸菌数は1系・2系ともに約 1.5×10^7 個/g、バチルスコロニー数は約 4×10^8 個/gであった。

それに対してし尿処理施設は、より高濃度のし尿が投入されるため、大腸菌数は下水処理曝気槽より多いと思われるが、実測値では各し尿処理施設の大腸菌数は 10^4 個/gから 10^5 個/gと低い値であった。特に、試料AとBでは、 10^3 以上の希釈倍率においては大腸菌が検出されなかった。また、観察できたバチルス菌のほとんどは、曝気槽中で優占化するとされている*Bacillus subtilis*であり、一般的な報告の通りであった。バチルスコロニー数は 10^7 個/gから 10^8 個/gという結果が得られ、すべてのし尿処理施設で予想以上にバチルス菌優占化が進んでいた。このことから、バチルス菌が分泌する抗菌物質が大腸菌数を抑制し

表-2 各し尿処理施設の大腸菌群数・大腸菌数
・パチルスコロニー数

施設	大腸菌群数 (MPN個/g)	大腸菌数 (MPN個/g)	パチルスコロニー数 (個/g)	MLSS (mg/l)
A	1.29E+05	0.00E+00	1.55E+08	13216
B	1.28E+05	0.00E+00	2.03E+08	13308
C	1.23E+07	2.24E+04	2.02E+08	8928
D	4.34E+06	4.34E+05	8.87E+07	11280
E	1.40E+07	8.92E+04	6.69E+08	7848
F	3.81E+06	3.81E+05	4.04E+08	8664
G	9.61E+05	2.44E+05	4.10E+08	13532
H	3.34E+07	3.20E+05	5.43E+08	7184
I	2.19E+06	5.36E+05	4.54E+08	9142
J	3.40E+06	1.42E+05	9.48E+07	23218
K	1.39E+07	5.69E+04	4.55E+08	3516
L	1.50E+06	1.61E+05	2.88E+08	8672
M	9.41E+05	5.70E+04	3.28E+08	3508
N	3.40E+08	9.92E+04	2.41E+08	7056
O	3.23E+05	1.13E+05	4.37E+08	6180
P	7.62E+06	1.62E+05	5.54E+08	4332
Q	1.01E+06	1.45E+05	3.31E+08	4832
R	2.81E+06	2.57E+05	4.27E+08	8546
Y(OD) 1系	-	1.55E+07	4.09E+08	
Y(OD) 2系	-	1.53E+07	3.54E+08	

(Y処理場は6/13~8/1までの平均)

表-3 各し尿処理施設の処理水水質

施設	pH	EC	Cl-	NH4-N	NOx-N	InorgN	P04-P	採水日
A	7.6	48	51	2.8	0.59	3.4	0	7月15日
B	8.6	287	456	0.29	0.09	0.38	0.39	9月10日
C	6.3	255	397	0.02	0.92	0.94	0.06	9月10日
D	7.3	248	798	0.02	1.5	1.5	0.05	9月10日
E	6.9	491	2260	1.3	7.4	8.7	0.04	9月13日
F	6.6	192	582	0.09	2.5	2.6	0.07	9月14日
G	7.1	272	332	0.08	0	0.08	0.03	9月14日
H	6.8	167	472	0.01	1.4	1.4	0.18	9月14日
I	7.2	411	1058	0	0.01	0.01	0.09	9月14日
J	7.1	283	410	1.2	2.9	4.1	0.04	9月14日
L	7.1	506	789	0.04	4.9	4.9	0.08	9月15日
M	8.4	644	1302	0.15	8.8	8.9	0.42	7月15日
O	7.4	67	122	0.03	5.9	5.9	0.08	9月13日
Q	7.4	88	154	0	1.6	1.62	7.68	9月14日
R	7.7	91	131	0.19	3.1	3.3	0.27	9月15日
平均	7.3	270	621	0.42	2.8	3.2	0.63	

注記: Q処理場は下水放流なので凝集沈殿処理水。単位はEC (mS/m)
その他はmg/l
InorgNは無機態窒素のことでNH4-NとNOx-Nの和

たことが考えられる。

OD特環下水処理施設と各し尿処理施設を比較すると、パチルスコロニー数は大差なかったが、大腸菌数は各し尿処理施設の方が大幅に少なかった。これは、下水処理に比べてし尿処理場は滞留時間が長いため、パチルス菌優占化により大腸菌が淘汰されたためだと考えられるが、このことは注目に値する現象であると思われる。

(2) 処理水水質

各し尿処理施設の処理水水質を表-3に示した。表-3のECおよびCl-濃度の値が低いことから、各処理施設とも投入負荷は定格の1/2前後と思われるが、放流水質は良好であった。低い希釈倍率(標脱の処理施設でも希釈倍率は高負荷と同等の所が多かった)にもかかわらず、T-N<10mg/l、T-P<1mg/lという基準以下の良好な水質であり、放流先の利根川に対する汚濁源としては、ほとんど無視することができるとと思われる。

4. まとめ

本研究では、大腸菌とパチルス菌を同時に高い精度で測定できる方法を実現し、群馬県内18カ所の処理施設の反応槽混合液を測定した結果を示したが、そこから次のことがわかった。

- 1) 調査対象としたすべてのし尿処理施設では、パチルス菌優占化が進行しており、大腸菌数が少ないことがわかった。
- 2) 大腸菌数が少ない理由として、各調査対象施設は投入負荷が比較的低く、かつ十分な滞留時間があること、そしてパチルス菌の持つ抗菌物質により抑制されていることが示唆された。
- 3) 各し尿処理施設の処理水水質は良好で、放流先河川への窒素負荷は無視できるほど小さい。

謝辞 群馬県内の各し尿処理施設には、サンプリングに多大なご協力をいただきました。また、パチルス菌の培養および測定、水質分析は岸分析主任にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Kim, E.H.(Eung-Ho)(2010): Low Cost & High Efficiency Advanced Wastewater Treatment Performances in Korea: Assessment of RABC process Technology, 第47回下水道協会研究発表会・アジアセッション
- 2) 小林彩乃、青井透(2008): パチルス優占化下水汚泥を種菌に用いて製造した土壌改良資材の連作障害抑制効果、第45回下水道研究発表会ポスターセッション
- 3) 枯草菌を用いた微生物農薬の開発 正田・阿野研究室(資源循環研究施設) <http://www.res.titech.ac.jp/~documets/rescurrent/0508/index-j.html>
- 4) 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局下水道環境部監修 下水試験方法 上巻-1997年度版- 社団法人日本下水道協会、pp698-712, pp723-724, pp770-771
- 5) 生方明日香、青井透(2010): 放流先河川水よりも低い処理水窒素濃度の特環OD法下水処理施設、第65回土木学会年次学術講演会