

海水活性汚泥の嫌気処理について

田邊幾之助・福永健一・谷口健二

(応用微生物学研究室)

昭和55年 8月10日 受理

A Contribution to Anaerobic Digestion of the Sea-Water-Activated Sludge

Ikunosuke TANABE, Ken'ichi FUKUNAGA, and Kenji TANIGUCHI

(Laboratory of Applied Microbiology)

緒 言

地場産業である旧式焼酎の蒸溜廃液の処理方法として海水活性汚泥法が可能なる方法であることはすでに証明して来た^{11,12)}。一方、この処理方式における海水活性汚泥の増殖量 ΔS は $\Delta S = 0.76L - 0.03S$ (ΔS , kg/m³/day; L , COD 除去量 kg/m³/day; S , MLSS kg/m³) で示されることも明らかにした。しかし、この余剰海水活性汚泥の処理方法が確立されなくては、海水活性汚泥法は完全であるとはいえない。特に、余剰汚泥の処理は、どの廃水処理方式においても緊急に解決をせまられている課題で、しかも、余剰海水活性汚泥の処理方式中、嫌気処理は、内陸からの汚染物質や魚の養殖にともなう食物残渣・汚物等が海底に堆積して出来たヘドロの処理と類似性がある。その研究結果は広く応用され得るという利点がある。そのため、余剰海水活性汚泥の嫌気処理が可能かどうかを検討することとなった。

一般に、汚泥の嫌気処理は、メタン発酵(炭酸呼吸)と有機酸等の発酵の並行複発酵を利用するもので、有機物濃度1%以上の濃厚な廃液や余剰汚泥の処理方法として、古くから多くの研究がある³⁾。一方、浅海の海底堆積物中にメタンが比較的高いレベルで検出されることから、海中でもメタン発酵が行なわれ得るものと判断出来る^{6,7)}。

今回は、海水を懸濁媒としてメタン発酵がおきるかどうか、又、海水活性汚泥がメタン発酵を受けるかどうかの二点を確かめたが、更に、嫌気処理を受けた汚泥

の微生物相の全体像の把握、および、メタン細菌の分離・計数についても多少検討を行ったので報告する。

材料と方法

嫌気消化にともなうガス発生量の測定には写真1の装置を使用した。海水中で嫌気消化、とりわけメタン発酵がおきるかどうかを証明するため、鹿児島市錦江汚水処理場の中温消化中の汚泥を種とし、これに余剰汚泥を等量加えた。いずれも 3,500rpm 15分間遠沈し懸濁媒を海水又は水道水に置き換えて実験を行った。温度条件としては 8°, 20°, 36° および 52°C をとった。発生ガス中のメタンの検出は消化汚泥と余剰汚泥の混合液を満たした三角フラスコに最も近い位置のゴム管からマイクロシリンジでサンプリング、日立 163 型ガスクロマトグラフ熱伝導度検出器 (Thermal Con-

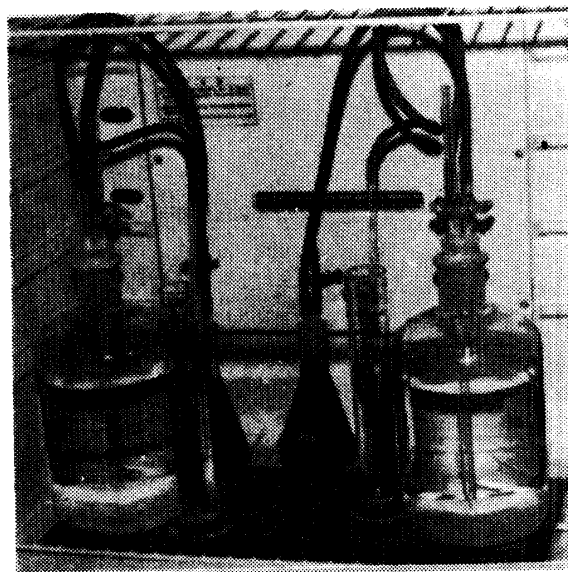


Photo 1. Apparatuses for digestion of the sea-water-activated sludge (excess-sludge).

* この研究は文部省環境科学特別研究の研究補助金を受けて行ったものの一部で、昭和52年度および昭和53年度の研究成果発表会で口演した〔生物的環境改善技術領域班研究成果発表会要旨、昭和52年度 p. 128-129 (1978)、昭和53年度 p. 147-149 (1979)〕。

Table 1. Gas-chromatogram-data

- 1) A datum for methane
 Column: Molecular Sieve 5A, ϕ 3m/m 2m stainless column.
 Column-Temperature: 60°C.
 Injection-Temperature: 71°C.
 Carrier-Gas: He.
 Flow-Rate: 30ml/min.
 TCD-Detector-Temperature: 30°C.
 Sample-Size: 0.4ml.
 Sensitivity: 1/32.
 Chart-Speed: 10mm/min.
- 2) A datum for hydrogen sulfide
 Column: Porapak R, ϕ 3m/m 6m teflon column.
 Column-Temperature: 60°C.
 Injection-Temperature: 70°C.
 Carrier-Gas: He.
 Flow-Rate: 30ml/mm.
 TCD-Detector-Temperature: 30°C.
 Sample-Size: 0.4ml.
 Sensitivity: 1/32.
 Chart-Speed: 10mm/min.

ductivity Detector : TCD) を使用し確認した。ガスクロマトグラフの操作条件は一例を示すと表1のとうりであった。

汚泥 DNA は MARMUR 法により調製した⁴⁾。汚泥 DNA の GC% はこれを試料として日立自記分光々度計 EPS-3T に装着した加熱セルホルダー (Thermotatted Cell Holder, 型式 123-0703) で熱変性曲線 (Thermal denaturation curve) を測定, $T_m = 69.3 + 0.41 GC$ で計算した⁵⁾ (写真2)。なお, 汚泥 DNA の回収率は SCHMIDT, THANNHAUSER, SCHNEIDER 法で定量した DNA 量に対して求めた⁹⁾。

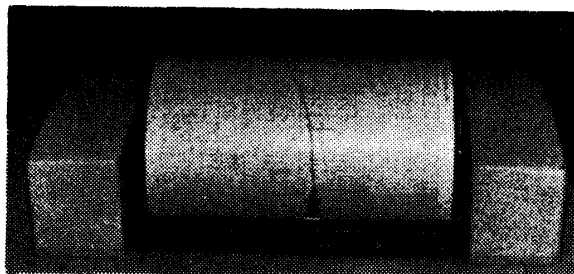


Photo 2. The thermal denaturation-curve of the mixed DNA of the activated sludge.

消化に関与するメタン細菌の計数は SIEBERT, HATTINGH 培地¹⁰⁾ (表2) で図1の計数用培養管を使用し培養 (写3), 発生したメタンをガスクロマトグラフ

Table 2. The sea-water-medium for isolation of methanogenic bacteria

1) A modification of SIEBERT and HATTINGH's enumeration-medium

Aged sea-water	800ml
Na-glycerophosphate	140mg
Fe-EDTA	10mg
NH ₄ Cl	600mg
Vitamin-solution*	1ml
0.05% alpha tocopherol/alcohol-solution	1ml
0.04% resazurine-solution	5ml
0.2% phenosafranine-solution	1ml
Fatty acid-mixture**	3ml
Reducing solution***	17ml
6.0% NaHCO ₃ -solution	143ml
Distilled water****	

* (mg in 250ml re-distilled water) Aneurine-HCl, 125; ascorbic acid, 125; riboflavin, 125; biotin, 50; cobione, 30; pyridoxamine-HCl, 250; folic acid, 50; p-aminobenzoic acid, 250; nicotinic acid, 125; choline, 125.

** (ml) Acetic acid, 17; pronionic acid, 4; butyric acid, 4; isobutyric acid, 1; n-valeric acid, 1; isovaleric acid, 1; 2-methyl-butyric acid, 1; isocaproic acid, 1.

*** Cysteine-HCl, 1.25g, added to 80ml of 0.1 N NaOH, volume adjusted to 100ml with distilled water, and 1.25g of Na₂S·9H₂O added.

**** The volume of the medium is adjusted to 1 liter with distilled water, and, if necessary, 50g of digested sludge (wet w.) might be added to the 1 liter-volume medium. Agar is added to the medium to give a final concentration of 0.8, or 1.0 per cent, if necessary.

2) A modification of HEUKELEKIAN and HEINEMANN's medium

Aged sea-water	800ml
NH ₄ Cl	1g
MgCl ₂	0.1g
K ₂ HPO ₄	0.4g
CH ₃ COONa	10g
yeast-extract	0.03g
Distilled water	200ml

* Agar 0.8 per cent, pH 7.6-7.8

Three ml of a sterile solution, containing 1 per cent of Na₂S·9H₂O and 5 percent of Na₂CO₃ was added to each 100ml of the medium prior to inoculation.

で確認出来た稀釈から McCRADY の方法で計算した⁹⁾。又, メタン細菌の分離は SIEBERT, HATTINGH 培地と HEUKELEKIAN, HEINEMANN 培地 (表2) を使用した²⁾。試料又はその稀釈液を培地と混合し, 図2の嫌気細菌分離培養管に吸引して固めた (写真4)。培養温度は 36° 又は 52°C で行った (写真5)。但し, 培地はいずれも mineral solution の代りに DL- α -グリセロリン酸二ナトリウム DL- α -glycerophosphoric acid, diso-

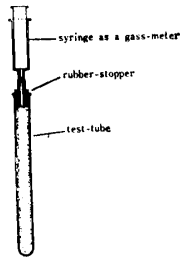


Fig. 1. The test-tube for enumeration of the methanogenic bacteria.

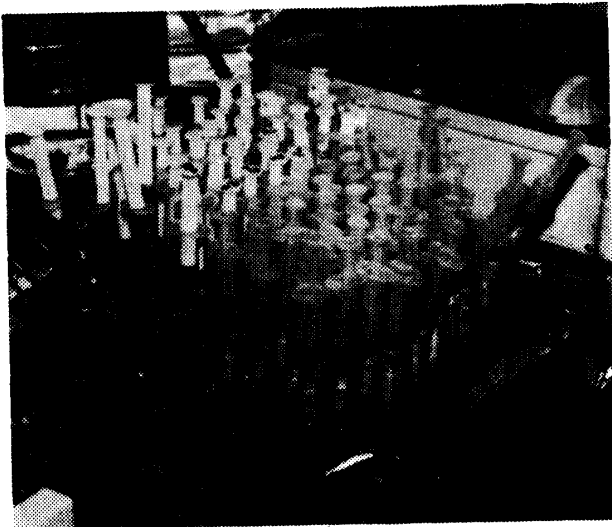


Photo 3. Incubation of the test-tubes for enumeration of the methanogenic bacteria in a digesting sludge.

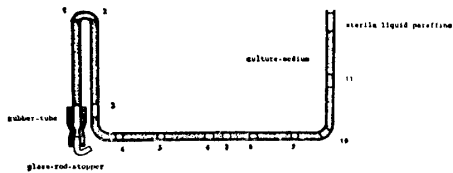


Fig. 2. The culture-tube for isolation of anaerobic bacteria at 52°C.

dium salt, 140mg/l とエチレンジアミン四酢酸鉄錯塩 ferric monosodium ethylene diamine tetraacetate, Fe-EDTA, 10mg/l を加えた海水を使用した。寒天は 0.8 または 1% とした。

結果および考察

海水中でもメタン発酵がおきるかどうかを検討した結果は図3に示したとおりである。ガス発生量から見て、種として用いた中温消化汚泥は、懸濁媒が水道水で 36°C に維持されると、非常に順調に経過している。しかし、52°C におかれると、ガス発生曲線に約 10日の遅れが認められた。これは中温消化の嫌気微生

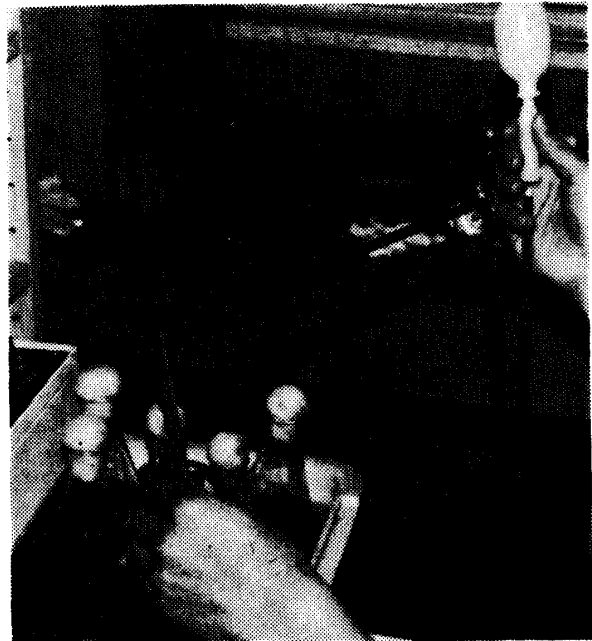


Photo 4. The culture-tube for isolation of anaerobic bacteria. An inoculated agar-medium is being sucked into the culture-tube with a pipetter.

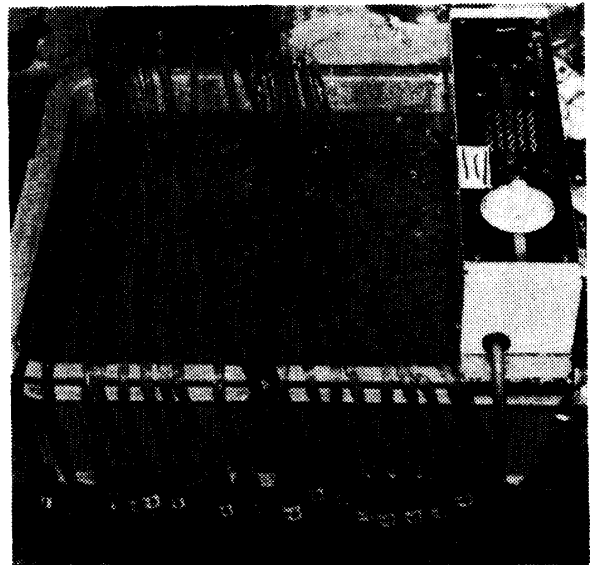


Photo 5. Incubation of the culture-tube at 52°C.

物相が高温消化にきり換るための必要な日数と考えられる。一方、懸濁媒を海水に置換したものは更にガス発生が遅れるが、それでも中温消化の場合は良好な経過を示している。ただ、高温消化の場合はガス発生が遅延すると同時に不安定な経過をも示した。しかし、どの場合でも、メタン発酵を行う微生物相の形成がガスクロマトグラフによる分析結果から証明出来た。又、特に海水中では、8° および 20°C の低温下、メタンの発生はほとんどないことも明らかとなったが、これ

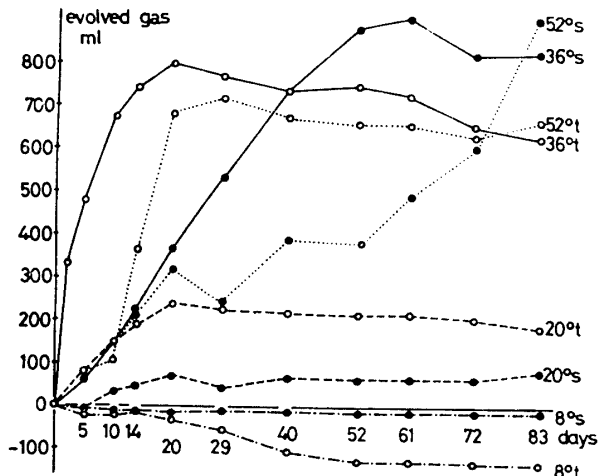


Fig. 3. Anaerobic digestion of the excess-sludge in the Kinkō sewage-treating plant, Kagoshima.

は外海はおろか通常の内海の海底でさえも有機性堆積物はメタン発酵を受けていないといえよう。同時に行った硫化水素の検出はいずれの場合でも認められなかったが、これは実験に供した素材の性質によるものと思われる。

次に、実験室規模で焼酎蒸溜廃液を海水活性汚泥で処理することにより生成した余剰海水活性汚泥の嫌気消化を検討した。前記の実験で定常状態になった消化汚泥の半量を種とし、これに同量の余剰海水活性汚泥を加えて試料とし、前記の実験と同一温度で培養した。結果は図4に示したとうりで、36°Cでは懸濁媒を水道水とした場合順調なガス発生が認められ、海水の場合でも約8日の遅延が認められただけで水道水の場合と似たガス発生経過であった。又、52°Cの高温消化も水道水の場合は培養開始後3週間は中温消化と同様の経過であったが、以後、ガス発生は止り、3カ月後のガス量は中温消化の半分であった。海水の場合、高温消化は初期はショックによる落ち込みが大きく、2カ月後にやっと水道水の場合とガス発生量に差がなくなった。20°Cでの嫌気消化はガス発生量が低いまま経過した。これらの実験から、余剰海水活性汚泥の嫌

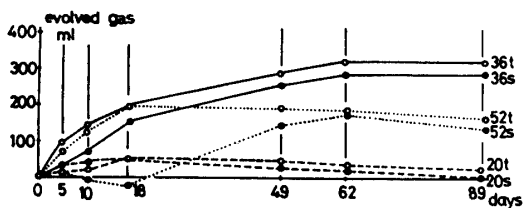


Fig. 4. Anaerobic digestion of the sea-water activated sludge.

気消化は懸濁媒を海水とする場合、36°Cの中温消化が好ましいことと結論づけられる。

以上の実験中、汚水処理場の余剰汚泥の嫌気消化は懸濁媒を海水に置換することによって微生物相についてかなり大きな変化がおきたことを予測させる。従って、この嫌気消化についても嫌気微生物相を明らかにしなければ適確な微生物管理は望めない。このため、以上の実験に付随して嫌気混合培養系の微生物相を明らかにするための方法を検討した。一般に混合培養系では、その構成微生物の分離方法が不適當であるとか、レベルの多様性のため、微生物の計数分離が十分な情報を提供しないことが多い。このため微生物の計数分離を補足し、微生物相の全体像を把握する試みとして、汚泥から常法で抽出した混合DNAの熱変性曲線とその曲線の中心 T_m を測定した。

先ず、嫌気混合培養系の中で主要な微生物群であると推定されるメタン細菌に注目し、その計数分離について検討した。試料として活性汚泥の中温および高温消化の定常期にある混合液を使用した。McCraryの方法は最小稀釈法を一稀釈5連で行い、得られた結果を推計学的に処理して菌数を算出するものである。結果は表3に示した。又、高温消化汚泥からのメタン細菌の分離は図2の嫌気細菌分離培養管で行った。培養1カ月後、培養管中に気泡が生じたので、それぞれの気泡部分の前後でガラス管を切り、寒天を通してシリンドでガスを抜きとり、ガスクロマトグラフにかけて気泡中のガス組成がメタンを主とするものであることを証明することが出来た(写真6)。しかし、気泡附近を実体顕微鏡で観察したが、はっきりそれと確認出来るメタン細菌のコロニーは見出すことが出来なかった。そのため、気泡のまわりの寒天部分をとり、新しく溶解した寒天培地に投入、ガラス棒でつきつぶしてから新しい培養管に吸い上げ、固めて同じ条件で培養したが、2カ月を経ても気泡もコロニーも生じなかった。しかし、表4に示したように 10^{-1} 稀釈 10ml 中、即、混合液 1ml 中の気泡数7個は先の計数 13/ml と

Table 3. Enumeration of methanogenic bacteria through the employment of the test-tubes for enumeration

suspending medium temperature	Enumeration/ml	
	tap-water	sea-water
36°C	50	5.0
52°C	2.5	13

Table 4. Counts of the gas-bubble, in which methane was detected

dilution	counts of a gas-bubble in 10 ml.	gas-bubble No. in the tube	detection of methane										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10 ⁻¹	7		+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	?

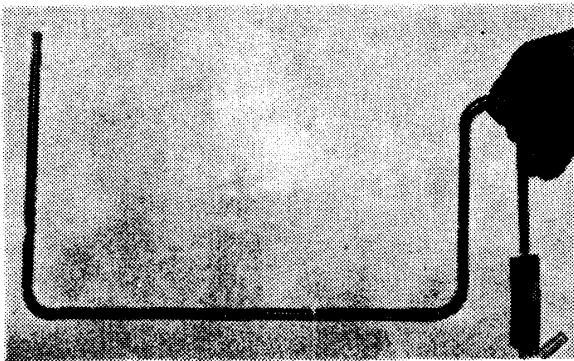


Photo 6. The culture-tube, in which methane was noted at all the bubbles.

ほぼ合致, 分離方法としては妥当であることがわかった。今後, 培地の検討が急務である。

次に, 混合培養系の微生物相の全体像を把握するため, 汚水処理場の中温消化汚泥と, 比較のため同処理場の活性汚泥とを実験に使用した。図5は中温消化汚泥の混合 DNA の熱変性曲線で, T_m=88.5°C, 従って GC=47% となり, 曲線が二段になる, 即ち, T_mの異なる二種以上の DNA からなる図6の活性汚泥のそれとは明らかに差がある。BERGEY's Manual 中にはこれに対応するデータはないが再現性があるので, 今後共, データの蓄積に期待出来る¹⁾。

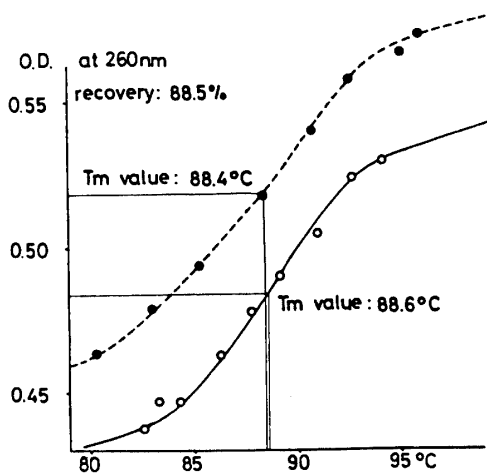


Fig. 5. Thermal denaturation-curves of the DNA-sample of the digested sludge in the Kinkô sewage-teating plant.

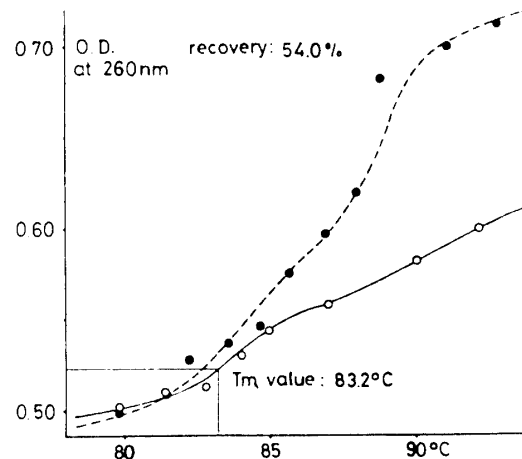


Fig. 6. Thermal denaturation curves of the DNA sample of the activated sludge in the Kinkô sewage-teating plant.

要 約

旧式焼酎蒸溜廃液を海水活性汚泥法で処理することによって生成する余剰汚泥の嫌気消化を検討した。先ず, 錦江処理場の中温消化中の嫌気汚泥の懸濁媒を海水にかえても, 多少の遅延はあるが, メタン発酵が継続しておきることが確かめられた。又, それに海水活性汚泥の余剰汚泥を投入しても, 引続いて嫌気消化がおき, メタンの発生が確かめられた。従って, 海水を懸濁媒としても, 又, 海水活性汚泥を投入しても嫌気消化, 特に, 中温消化ならば良好な結果が得られることが明らかになった。又, 嫌気微生物相を明らかにするため, 嫌気微生物の計数・分離方法とともに, 相の全体像を把握する手段として汚泥の混合 DNA 試料の熱変性曲線を利用する方法についても検討を加えた。

文 献

- 1) Buchanan, R.E. (editor): BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 2) Heukelekian, H. and B. Heinemann: Studies on the methane bacteria. I. Development of a method for enumeration, *Sewage Wks J.*, 11, 426-435 (1939)
- 3) Kirsch, E.J. and R.M. Sykes: Anaerobic digestion in biological waste treatment, *Progress Ind. Microbiol.*, 9,

- 155-237 (1971)
- 4) Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218 (1961)
 - 5) Marmur, J. and P. Doty: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature, *J. Mol. Biol.* **5**, 109-118 (1962)
 - 6) Martens, C.S. and Berner, R.A.: Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments, *Science*, **155**, 1167-1169 (1974)
 - 7) Oremland, R.S.: Methane production in shallow-water, tropical marine sediments, *Appl. Microbiol.*, **30**, 602-608 (1975)
 - 8) Pochon, J.: Manuel Technique d'Analyse Microbiologique du Sol, Masson et Cie, 34, (1954)
 - 9) Schneider, W.C.: Phosphorus compounds in animal tissues. III Comparison of methods for the estimation of nucleic acids, *J. Biol. Chem.*, **164**, 747-751 (1946)
 - 10) Siebert, M.L. and W.H.J. Hattingh: Estimation of methane-producing bacterial numbers by the most probable number (MPN) technique, *Water Research*, **1**, 13-19 (1967)
 - 11) Tanabe, I., M. Fujii, Y. Kamimura, S. Yoshii, H. Kuboyama, T. Nagata-Maehara, H. Kawaji, and T. Sonoda: Studies on the Biological treatment of the Shôchû-distiller's Slops by the sea-water activated sludge, *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **15**, 131-143 (1979)
 - 12) 田邊幾之助・田実博美・真角孝則・上村幸廣・吉井右・久保山宏・前原哲勝・大林晃: 旧式焼酎醸造の微生物学的研究(第4報) 蒸溜廢液の処理について, 鹿大農學術報告 No. **24**, 171-180 (1974)

Summary

In this study, some investigations were executed on anaerobic digestion of the excess-sludge produced on way of the treatment of the Shôchû-distiller's slops with the sea-water-activated sludge.

The following two phenomena were ascertained, firstly, that even if the suspending-medium of the mesophilic anaerobic-sludge in the Kinkô-sewage-treating-plant was exchanged for sea-water, methane-fermentation was carried on continuously, only with a considerable delay of gas-production; secondly, that even if the excess-sludge of the sea-water-activated sludge was added to the digested sludge in sea-water in order to be subjected to an anaerobic treatment, the methane-gas-production was observed. On the other hand, in order to clarify the anaerobic microflora, some attempts were made on to the following items ; (1) the enumeration and isolation of anaerobic micro-organisms of the sea-water activated sludge, and (2) a trial on the speculation of an exact anaerobic-microflora, basing on the thermal denaturation curves of the mixed DNA, extracted from the digested sludge.