

活性汚泥法処理水およびメタン発酵脱離液中のビタミン B₁₂ の定量について

田邊幾之助・浜田史郎

(応用微生物学研究室)

昭和56年8月10日 受理

Measurement of Vitamin B₁₂-Concentrations of the Effluent in the Activated-Sludge-Process and of the Supernatant Liquor in the Anaerobic Digestion

Ikunosuke TANABE and Shiro HAMADA

(Laboratory of Applied Microbiology)

緒 言

昭和52年, 梅雨明け頃, 鹿児島市一号用地(市南岸の埋立地) 沖や海潟沖, 大崎鼻沖等の海面に *marine Englena* である *Hornellia marina* の赤潮が発生し, 大量の養殖ハマチが斃死した. これは錦江湾(鹿児島湾) 域での人口増および生活水準の向上にともなう汚濁物質の流入量増加と養殖漁業による水域中の汚濁物質の増加によるものと考えられている. 一般に経済的な面で生態系に大きな被害を与えるタイプの赤潮をひきおこすプランクトンは多数あるが, なかでも鞭毛藻類のおこす赤潮で被害が最も大きい. とくに, 赤潮発生要因として, ①水域の富栄養化, すなわちリン酸, 窒素化合物などの栄養塩類の増加, ②塩分低下, とくに梅雨期に大型河川の流入する水域, ③生育因子(チアミン, ビオチン, ビタミン B₁₂) 量の増加, ④日照および 21°~22°C の水温, とくに梅雨の晴れ間, などがあげられているが, これらの条件はいずれも赤潮鞭毛藻の生育至適条件である. このうち, 生育因子については従来から数多くの研究があり, 赤潮鞭毛藻を含め微細藻類に顕著な生理活性を示すのは上記3種の水溶性ビタミン B 群であるという^{2,4)}.

昭和41年来, 我々は海水活性汚泥法による廃水処理を検討して来た^{5,6,7,8)}. これはとくに水の不足する地域での廃水処理方式として開発して来たものであるが, さらにハマチ等の養殖業による水域の汚染防止に応用することをも目的として来た. ところで, 活性汚泥が微生物の塊であることと地球上でのビタミン B₁₂

の生産者は細菌類にのみ限られるということとを考えると, 活性汚泥法による廃水処理にも一つの解決しなければならない難題, すなわち活性汚泥中の細菌によるビタミン B₁₂ 類の産生・摂取を正確に把握し, これに対応しなければならないということである.

まず, 手始めに, 鹿児島市の錦江処理場の活性汚泥法処理水および消化汚泥の脱離液のビタミン B₁₂ 群を乳酸菌によってバイオアッセイしたので報告する.

材料と方法

1. 試料

鹿児島市水道局錦江処理場の曝気槽流入水(influent, スクリーンを通した都市下水に消化槽脱離液を返送して加えたもの)と活性汚泥法処理水(effluent)および汚泥消化の脱離液を使用した. 活性汚泥処理水は最終沈澱池の流出水で昭和50年10月17日, 11月20日, 12月20日および昭和51年1月19日に, また, 消化槽脱離液は昭和50年11月20日および12月20日に第二次消化槽からの脱離液を採水し実験に供した. 錦江処理場の汚泥消化は余剰汚泥を汚泥濃縮槽で滞留15時間濃縮し, 濃縮した汚泥を第一次消化槽に送り, ここで滞留20日間 35°C 前後で中温消化させ, さらに第二次消化槽に移して5日間消化を続けながら脱離液を分離するようになっている. なお, 対照として, 実験室で形成させた水道水活性汚泥によって焼酎蒸溜廃液を処理した処理水^{6,8)}および焼酎蒸溜廃液の B₁₂ 群も測定した.

2. バイオアッセイ

定量用培地としては Bacto vitamin B₁₂ assay medium

を使用した。

通常、B₁₂ 定量には *Lactobacillus lactis* IAM 1173 (ATCC 8000, IFO 3071), *L. leichmanii* IFO 3376 (ATCC 7830), *L. leichmanii* IFO 3073 (IAM 1196, ATCC 4797) の3菌株のいずれかが用いられることが多い。予備実験では前2者のレスポンスが安定であったので、実験にはこれら前2者を使用した。保存培地としては *L. leichmanii* IFO 3376 には酵母エキス, 2%; ポリペプトン, 0.5%; ぶどう糖, 1%; KH₂PO₄, 0.2%; ツィーン80, 0.01%; トマトジュース遠沈上清, 10%; 寒天, 1%; pH6.7, また, *L. lactis* IAM 1173 には酵母エキス, 1%; ポリペプトン, 0.5%; ぶどう糖, 1%; 酢酸ソーダ, 0.5%; KH₂PO₄, 0.2%; ツィーン80, 0.1%; トマトジュース遠沈上清, 10%; 寒天, 1%; pH 6.8 とした。

3. 試料の前処理

熱に不安定なビタミン B₁₂ の一つ、ヒドロキシコバラミン hydroxycobalamin を含めて定量するためには、シアン化カリと加熱して熱に安定なシアノコバラミン cyanocobalamin として定量する⁹⁾。この研究ではいずれも試料が液体なので試料 1ml に 0.1% KCN 溶液を 2ml 加え、30分間湯煎で加熱する。これに再溜水を加えて所定の濃度としバイオアッセイの試料とした。バイオアッセイの試料の希釈は曝気槽流入水および活性汚泥法処理水では 1/10, 3/10, 1/2, 汚泥消化の脱離液は 1/100, 3/100, 1/20, 水道水活性汚泥の処理水では希釈しないで 1, 3, 5ml を定量用培地に添加した。蒸溜廃液の上清は 1/100 希釈液としてこれを定量用培地に 0.5~5ml 加えて定量を行った。

4. 定量

定量は常法通り行った⁹⁾。また、接種用菌液として定量用培地にビタミン B₁₂ 0.5ng/tube を加えた液体

培地で 37°C 24時間培養後定量用培地で2回洗浄し、同培地で5倍希釈となるように懸濁したものを使用した。接種のサイズはこの菌液を試験管あたり1滴づつとした。なお、回収率の検討は定量と同時にを行った。定量用培地にビタミン B₁₂ 0.1ng/tube を加えたものに、それぞれの試料につき希釈度の大きい2点を別々に加え実験値を求め、理論値から回収率 % を計算した。

定量は酸度滴定で行った。また、1つの希釈について少くとも三連で実験を行った。

結果および考察

1. 曝気槽流入水と処理水中のビタミン B₁₂

定量結果は表1のとおりである。測定日により多少の変動はあるが、流入水と処理水のビタミン B₁₂ レベルは *L. leichmanii* IFO 3376 で定量したものはそれぞれ 0.04~0.17ng/ml, 0.02~0.06ng/ml, *L. lactis* IAM 1173 で定量したものはそれぞれ 0.12~0.34ng/ml, 0.07~0.15ng/ml である。このようにどちらの菌株で測定しても流入水でわずかに高く、処理水でわずかに低い結果となったが、このことは流入水には汚泥消化の脱離液の返送流入があるために高いものと思われる。また、その活性汚泥法による処理でともかくも約50%のビタミン B₁₂ が除去されたことが確かめられた。ただ、この処理水中のビタミン B₁₂ レベルは *Euglena gracilis* によって定量した錦江湾のレベルが 0~15ng/l であるのに比較してそれ程大きい数値ではないので²⁾、海水中のビタミン B₁₂ レベルの上昇にどの程度加担しているのであろうか。今後検討しなければならぬ問題ではあるが、活性汚泥法により脱離液からのビタミン B₁₂ をかなり除去出来ている点は注目してよい。

Table 1. Vitamin B₁₂-activity of the influent and the effluent in the Kinkô-sewage-treating-plant, measured with *Lactobacillus leichmannii* and *L. lactis*

| date of sampling | | vitamin B ₁₂ -activity, (ng/ml) | | | |
|------------------------------------|----------|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | Oct. 17 1975 | Nov. 20 1975 | Dec. 20 1975 | Jan. 19 1976 |
| <i>L. leichmanii</i> , IFO 3376 | influent | 0.17 | 0.04 | — | 0.08 |
| | effluent | 0.06 | 0.02 | — | 0.02 |
| | removal* | 65 | 50 | — | 75 |
| <i>L. lactis</i> , IAM 1173 | influent | 0.27 | 0.34 | 0.16 | 0.12 |
| | effluent | 0.15 | 0.15 | 0.11 | 0.07 |
| | removal* | 45 | 56 | 31 | 42 |

* Removal of vitamin B₁₂ (%) by the activated-sludge-process.

Table 2. Vitamin B₁₂-activity of the supernatant liquor from the digester of excess-sludge in the Kinkô-sewage-treating-plant, measured with *Lactobacillus leichmannii* and *L. lactis*

| date of sampling | vitamin B ₁₂ -activity, (ng/ml) | |
|--------------------------------|--|--------------|
| | Nov. 20 1975 | Dec. 20 1975 |
| <i>L. leichmannii</i> IFO 3376 | 2.43 | — |
| <i>L. lactis</i> IAM 1173 | 4.43 | 1.84 |

2. 汚泥消化の脱離液のビタミン B₁₂

脱離液のビタミン B₁₂ レベルは表 2 のとおりで、*L. leichmannii* IFO 3376 で 2.43ng/ml、*L. lactis* IAM 1173 で 1.84~4.43ng/ml である。このような脱離液でビタミン B₁₂ レベルが高いのは汚泥消化の主要な細菌のメタン細菌がビタミン B₁₂ 形成能を有することと関連があると思われる³⁾。現在、脱離液は活性汚泥法に返送されてそれに含まれるビタミン B₁₂ は回収されているものと判断出来て問題ではないように思われるが、さらに検討を要する。

3. 水道水活性汚泥法による処理水中のビタミン B₁₂

旧式焼酎蒸溜廃液中のビタミン B₁₂ レベルは表 3 の通りであった。決して多い数値ではないが、これを廃水処理する場合はこのレベルをどの程度下げることが出来るかが問題である。池の水から蒸溜廃液をフィードして形成させた水道水活性汚泥で蒸溜廃液を半連続処理した時の流入水と処理水のビタミン B₁₂ の定量結果も表 3 に示した。流入水は蒸溜廃液を 60 倍に稀釈し、約 COD 300ppm とし、COD 負荷量 0.3kg/m³/day として処理する。結果としては、流入水より処理水でビタミン B₁₂ レベルが高い。これは負荷量が小さく半連続処理なので負荷が間歇的になり、処理中どうしても飢餓状態で曝気を続けることになる。このた

め、一度汚泥中に回収したビタミン B₁₂ が再び処理水中に溶出するものと考えられる。この事実は汚泥消化の際の脱離液中にビタミン B₁₂ レベルが高いことと考え合せて廃水処理における曝気・攪拌・沈澱などの管理が重要な問題であることを示している。

要 約

近年、我国各地の内海水面で環境汚染が原因で赤潮が多発している。赤潮の発生要因は複雑であるが、赤潮鞭毛藻はほとんどが必ずといってよいくらい生育にビタミン B₁₂ を要求する。また、下水処理、汚泥処理にともなって排出する処理水、脱離液中には細菌の生産するビタミン B₁₂ が存在すると思われるので、これらのビタミン B₁₂ レベルを正確に把握して対応策を考えなくてはならない。

ビタミン B₁₂ の定量は乳酸菌 *Lactobacillus leichmannii* IFO 3376 および *L. lactis* IAM 1173 を使用してバイオアッセイした。

活性汚泥法で流入水および処理水中のビタミン B₁₂ レベルはそれぞれ *L. leichmannii* では 0.04~0.17ng/ml、0.02~0.06ng/ml、*L. lactis* では 0.12~0.34ng/ml、0.07~0.15ng/ml であった。いずれの数値をとっても流入水中のビタミン B₁₂ が活性汚泥法による処理を経て約 50% 除去されていることが確かめられた。

一方、メタン発酵脱離液のビタミン B₁₂ 値は高く *L. leichmannii* で 2.43ng/ml、*L. lactis* で 1.84~4.43 ng/ml を示し、対照として行った旧式焼酎蒸溜廃液ではそれぞれ 10ng/ml、14ng/ml であった。ところが、この蒸溜廃液を水道水活性汚泥で半連続処理すると処理水のビタミン B₁₂ 値は流入水よりもかえって高い値を示し、負荷が断続するような処理はビタミン B₁₂ 除去という点で好ましくないことがわかった。

文 献

1) Cooperman, J. M., R. Drucker, and B. Tabenkin:

Table 3. Vitamin B₁₂-activity of the supernatant of the Shôchû-distiller's slops, and the influent and the effluent in the laboratory-apparatus of the tap-water-activated-sludge, measured with *Lactobacillus leichmannii* and *L. lactis*

| sample treatment | supernatant of the Shôchû-distiller's slops, (ng/ml) | | tap-water-activated-sludge, (ng/ml) | |
|--------------------------------|--|---------------|-------------------------------------|------------------------|
| | no cyanide | cyanide added | influent cyanide added | effluent cyanide added |
| <i>L. leichmannii</i> IFO 3376 | 9 | 10 | 0.015 | 0.027 |
| <i>L. lactis</i> IAM 1173 | 14 | 14 | 0.033 | 0.036 |

- Microbiological assays for vitamin B₁₂: Acyanide enhancement effect, *J. Biol. Chem.*, **191**, 135-141 (1951)
- 2) 柏田研一・金沢昭夫：生物活性物質／ビタミンを中心として，*海洋科学*，**1** (12)，26-31 (1969)
 - 3) Knivett, V.A.: The microbiological production of vitamin B₁₂ and sulfide from sewage, *Progress in Industrial Microbiology*, **2**, 27-45, (1960)
 - 4) 大和田紘一：微生物を用いる海水中の微量成分に関する研究，*海洋科学*，**5** (9)，42-47 (1973)
 - 5) 田邊幾之助：旧式焼酎蒸溜廃液の海水活性汚泥による処理とその微生物生態学的局面，「環境科学」研究報告，109-123 (1980)
 - 6) Tanabe, I.: Microbiological studies of the sea water activated sludge, *Microbiology for Environment Cleaning*, 74-86 (1978)
 - 7) 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)
 - 8) 田邊幾之助・田実博美・真角孝則・上村幸広・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）蒸溜廃液の処理について，*鹿大農学術報告*，**No. 24**，171-180 (1974)
 - 9) 東京大学農学部農芸化学教室：実験農芸化学，上巻，p. 268-281，朝倉書店，東京 (1956)

Summary

Recently, red waters have often been caused by environmental pollutions in the various inland-seas in Japan. For their growth, most of the red water-algal flagellata require vitamin B₁₂, one of the lot of factors inducing red waters, and a considerable amount of vitamin B₁₂ is found in the effluent and the supernatant liquors from the sewage-treating-plants. We might cope with the red water-problems through fixing the amount of vitamin B₁₂.

A microbioassay of vitamin B₁₂ was carried out by employing the lactic acid-bacteria, *Lactobacillus leichmannii* IFO 3376, and *L. lactis* IAM 1173.

The amount of vitamin B₁₂ in the influent into the activated sludge-plant is 0.04 to 0.17 ng/ml with *L. leichmannii* and 0.12 to 0.34 ng/ml with *L. lactis*, and that in the effluent is 0.02 to 0.06 ng/ml and 0.07 to 0.15 ng/ml, respectively. This result confirms that 50 percent of the amount of vitamin B₁₂ in the influent was removed by the activated sludge-treatment.

The amount of vitamin B₁₂ in the supernatant liquor from the methane fermentation showed a comparatively high value of 2.43 ng/ml with *L. leichmannii* and 1.84 to 4.43 ng/ml with *L. lactis*.

The vitamin B₁₂-concentration in the Shôchû-distiller's slops amounts to 10 ng/ml with *L. leichmannii* and 14 ng/ml with *L. lactis*; and the vitamin B₁₂-concentration in the effluent which is semi-continuously treated by the tap-water-activated-sludge, exceeded that of the influent. An intermittent supply of load was found to be undesirable for the removal of vitamin B₁₂.