

## 海水活性汚泥法における環境制限因子としての界面活性剤の使用について\*

田邊幾之助・深谷嘉亮・永安 修・朝倉順子

(応用微生物学研究室)

昭和60年8月10日 受理

### Employment of Some Detergents as a Circumstance-Restricting Agent in the Sea-Water-Activated Sludge-Process

Ikunosuke TANABE, Yoshiaki FUKATANI, Osamu NAGAYASU, and Junko ASAKURA

(Laboratory of Applied Microbiology)

#### 緒 言

昭和41年来、旧式焼酎の蒸溜廃液を処理する目的で、海水を懸濁媒とする海水活性汚泥法を検討して来た<sup>2-4, 8-10)</sup>。また、海水活性汚泥法の微生物相とその処理能、沈降能との間に法則性を見出し、この処理方式の微生物管理の一助とするための研究もあわせて行ってきた<sup>2-9)</sup>。さらに、前報<sup>9)</sup>で報告したように海水活性汚泥での処理中、*Hypotrachae* を中心とした繊毛虫類が大量に増殖して海水活性汚泥のフロックを蚕食し、このためフロックの瘦削や破壊がおきて、これが海水活性汚泥の沈降性の悪化の一因であることも明らかにした。

今回は、米麴甘藷仕込焼酎および米麴米仕込焼酎の蒸溜廃液の連続処理中、界面活性剤を環境制限因子として使用することによって大量に発生した原生動物類を駆除することを目的として研究を進めた。また同時に、海水活性汚泥に対する界面活性剤の影響についても処理能、汚泥容量指標 (SVI, sludge volume index)、微生物相などを指標として明らかにしたので報告する。

#### 材 料 と 方 法

##### 1. 蒸溜廃液の分析

実験に供した廃液は小正醸造(有)日置工場で採取した米麴甘藷仕込焼酎および米麴米仕込焼酎の蒸溜廃液である。研究室に持ち帰り、3,500 rpm 10分間遠心

この研究は文部省科学研究費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、日本醸造工学会大会シンポジウム『環境浄化技術』(日本生命中之島研究所、大阪市、昭和57年11月10日)で講演した。講演要旨集 p. 96-97。また、『環境科学』研究報告集 B139-R31 生物的手法による環境改善技術, p. 8-11 (昭和57年3月), および『環境科学』研究報告集 B164-R31 生物的手法による環境改善技術 II, p. 5-8 (昭和58年3月)にも報告した。

分離した上澄について実験を行った。以下、廃液とはこの上澄の中和したものをさす。化学的酸素要求量 (chemical oxygen demand, COD) およびリン酸などは前報と同様<sup>4, 9)</sup>、日本工業規格「工場排水試験方法 JIS K 0102-1971」(日本規格協会)に従って分析した。また、全窒素はコンウェイ・スミスのマイクロキエルダール法により定量した<sup>1)</sup>。

##### 2. 界面活性剤の海水活性汚泥微生物の生育に及ぼす影響

Table 1 に示した分離用培地を試験管に 4 ml ずつ分注、高圧滅菌後、純水に溶かし濾過滅菌した界面活性剤(三洋化成工業, Table 4) 溶液を 1 ml ずつ加えてそれぞれ 10, 100 および 1,000 ppm の濃度としたものを用いた。これに海水活性汚泥微生物を接種し、濁度をクレット光電光度計(富士工業)で測定して界面活性剤の生育に及ぼす影響を調べた。

Table 1. Culture-medium used for bacterial isolation and cultivation in this experiment

Isolation-medium for sea-water-activated sludge-bacteria		
Glucose	1	g
Polypepton	3	g
Shōchū-distiller's slops-supernatant, diluted 1:4 with aged sea-water	500	ml
Sea-water-activated sludge-supernatant	100	ml
75%-Aged sea water	400	ml

pH 7.6-7.8

##### 3. 界面活性剤の海水活性汚泥および海水活性汚泥微生物の呼吸に及ぼす影響

海水活性汚泥の呼吸に及ぼす影響を検討するため試料の調整は次のように行った。30分間静置の海水活性汚泥 50 ml をとり、400 rpm (27×g) で1分間遠

心分離後、人工海水（アクアマリン、八洲薬品）で二回洗浄し、50 ml の海水活性汚泥懸濁液としたものを海水活性汚泥試料とした。一方、海水活性汚泥微生物は前報<sup>9)</sup>で報告した汚泥より分離した細菌64株を分離用培地でそれぞれ24時間振盪培養したものについて、滅菌海水で二回洗浄後、滅菌海水に懸濁したものを実験に供した。なお、懸濁液の微生物の乾物重は Table 5 に示してある。実験に使用した反応混液は海水活性汚泥懸濁液または微生物懸濁液 2 ml に基質溶液 1 ml および界面活性剤溶液 1 ml を加え全量 4 ml とした。呼吸基質には人工海水で COD 300 ppm に希釈した米麴甘藷仕込焼酎および米麴米仕込焼酎の蒸溜廃液を用いた。なお、自家呼吸測定には基質溶液と界面活性剤溶液を加えず、人工海水を 2 ml 加えて測定し、対照は基質溶液 1 ml のみで人工海水 1 ml 加えて全量 4 ml として実験した。なお、測定には生物酸素モニター (YSI 53型, Yellow Springs Instrument Co., Inc) を使用し、30°C で 50% の酸素消費に要する時間を計測した。自家呼吸における 50% の酸素消費に要する時間と対照のそれとの差を 100% として、界面活性剤添加によってそれぞれの場合の酸素消費に要する時間が対照と比較してどのくらいかで示した。たとえば、100% 以上の時は界面活性剤によって酸素消費が促進されることを示し、100% 以下は抑制されていることをあらわしている。

#### 4. 海水活性汚泥による連続処理実験

連続処理実験は Photo 1 に示した有効曝気槽容 8.93 l の完全混合型曝気槽を用い、汚泥容量 (SV, sludge volume) 10%, COD 負荷量 0.32 kg/m<sup>3</sup>/day, 水量負荷量 1.0 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/day, 廃液の COD 300 ppm, 加える界面活性剤はカチオン G-50 (Dodecyl-dimethylbenzylammonium chloride) または直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS, linear sodium alkylbenzenesulfonate) を廃液中 10 ppm となるよう加えた。なお、米麴甘藷仕込焼酎の蒸溜廃液については界面活性剤の流下実験に先立ち、廃液の COD 濃度を一定とし水量負荷を可変および水量負荷を一定とし廃液の COD 濃度可変したがって COD 負荷量可変の二組の処理実験を前報と同様に検討した<sup>9)</sup>。

処理水中の残存界面活性剤の簡易アッセイとしては界面活性剤に感受性の高い *Pseudomonas sp.* No. 7 株を使用してペニシリンカップ法で定量した。

海水活性汚泥からの微生物の分離はスポット寒天平板法により<sup>2,7)</sup>、また、分離した微生物の同定は常法により行った。

### 結果と考察

#### 1. 蒸溜廃液の分析

結果は Table 2 に示したように米麴甘藷仕込焼酎の蒸溜廃液は COD が 23,000~24,000 ppm, 全窒素

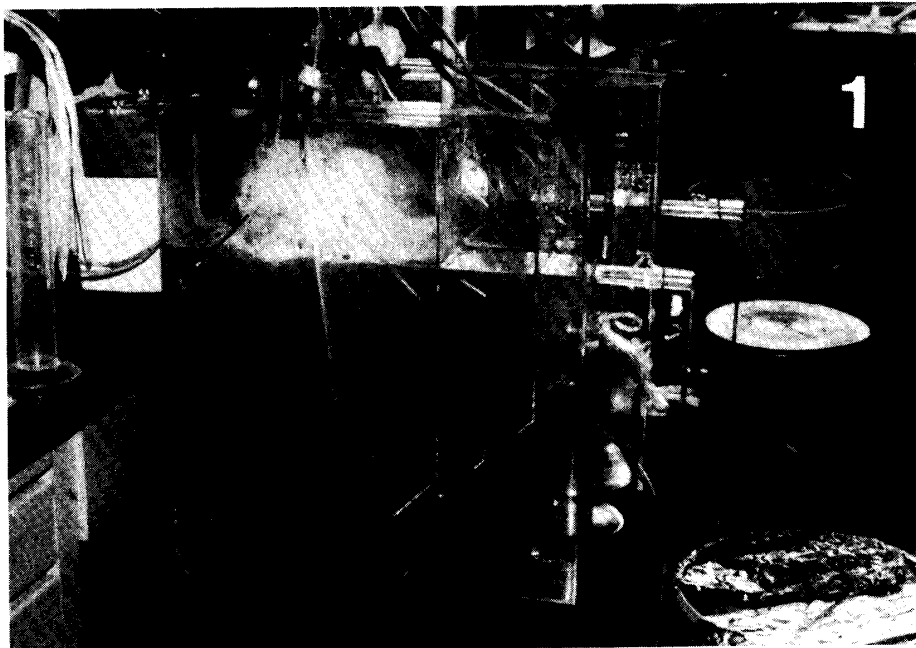


Photo 1. Completely mixed continuous-flow reactor for experimental waste-treatment, in which the diluted Shōchū-distiller's slops containing LAS at 10 ppm, is treated, foaming vigorously (this side).

Table 2. Analyses of the supernatant of the Shôchû-distiller's slops

Analysis	Shôchû	Rice-koji-sweet potato-Shikomi-Shôchû		Rice-koji-rice-Shikomi-Shôchû
Dry weight, ppm				17,000
pH				4.0
COD, ppm		22,700	24,100	23,000
Total nitrogen, ppm		2,350		2,580
Total phosphorus, ppm		137	194	303
COD:N:P*		100:10:0.6-0.8		100:11:1.3

\* Rate of COD:total nitrogen:total phosphorus.

2,350 ppm, リン酸態リンとして 140~190 ppm, また, 米麴米仕込焼酎の蒸溜廃液も COD 23,000 ppm, 全窒素 2,580 ppm, リン酸態リンとして 300 ppm とほぼ同じような結果が得られた. これらは前報<sup>10)</sup>に報告したものと醗の蒸溜条件が異なることから同一レベルでは比較できないが, この両者の COD:全窒素の比はほぼ同じなので妥当な値であるように思う. 一般に焼酎蒸溜廃液では生物化学的酸素要求量 (biochemical oxygen demand, BOD) と COD の比は BOD  $\approx$  2 COD とみなしてもあやまりはないので, 廃水の生物処理での適正な BOD:N:P 比は COD:N:P 比であらわすと 100:10:2 となる. ところが, 分析の結果はそれぞれ 100:10:0.6~0.8 および 100:11:1.3 となって, いずれもリンの量が適正範囲からはずれる. しかし, 問題にするほどの値ではないと判断出来たので, リン酸塩を強化せずこのまま希釈して実験に供した.

## 2. 界面活性剤の細菌の生育に及ぼす影響

Table 3 に示した界面活性剤 5 種に対する前報<sup>9)</sup>で分離した海水活性汚泥細菌の生育レスポンスから明らかにした. アニオン系界面活性剤であるノニポール S-40 (polyoxyethylene nonylphenylether sulfate) とニューポール PE-64 (polyoxyethylene と polyoxypropylene のブロック共重合物) ではほとんどの場合, 1,000 ppm の濃度になるような加えても細菌の生育が普通に認められた. 一方, カチオン系活性材であるカチオン G-50 (Dodecyldimethylbenzylammonium chloride, benzalkonium chloride) と臭化セチルトリメチルアンモニウム (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB, 和光純薬) では 10 ppm でも半数の細菌で生育が認められなかった. したがって, これらカチオン系界面活性剤をたとえ 10 ppm でも環境制限因子として適用するなら, 海水活性汚泥微生物相に大きな影響が出るものと判断される. なお, 両性の界面活性剤で

あるレボン 15 (sodium alkyl-di(aminoethyl)-glycine) はアニオン系とカチオン系界面活性剤の中間の抗菌スペクトルを示した. さらに Table 4 に示した 15 種類の界面活性剤の海水活性汚泥の代表細菌である *Aeromonas punctata* No. 15, *Pseudomonas* No. 7 および *coryneform bacteria* No. 41 に対する抗菌スペクトルは同表に示してある. 既述の界面活性剤以外ではアニオン系のアルキルベンゼン磺酸ナトリウム (sodium alkylbenzenesulfonate, LAS), サンデット LTD (alkylsulfate triethanolamine), サンモリン OT-70 (dioctyl sodium sulfosuccinate), カチオン系のレボン TM-16 (cetyltrimethylammonium chloride, CTAC), ノニオン系のノニポール 85 (polyoxyethylene nonylphenylether), ノニポール D-160 (polyoxyethylene dinonylphenylether), エルマルミン 70 (polyoxyethylene cetyl/oleylether), イオネット DO-400 (dioleic polyoxyethylene glycol), イオネット S-20 (monolauryl sorbitan), プロファン EX-24 (coconut oil fatty acid diethanolamide) および両性界面活性剤のレボン 101-H (2-undecyl-N-carboxymethyl-N-hydroxyethyl imidazolium betaine) である. 全体的に見て, カチオン系の界面活性剤の生育阻止効果が大きいことと海水活性汚泥細菌の細菌間での界面活性剤の生育阻止効果の差がかなり大きい. すなわち, 比較的界面活性剤の影響を受けにくい *Vibrio*, *Aeromonas* および *Pseudomonas* などと影響を受けやすい *Alcaligenes*, *coryneform bacteria* および一部の *Pseudomonas* などが明らかになった.

## 3. 界面活性剤の海水活性汚泥および細菌の呼吸に及ぼす影響

まず, 海水活性汚泥細菌の呼吸に及ぼす界面活性剤の影響を検討した. これは活性汚泥の処理能は活性汚泥を構成する個々の微生物の呼吸能の集約されたものであり, 微生物の生育できないような条件でも呼吸能

Table 3. Growth responses of the sea-water-activated sludge-bacteria in presence of a detergent\*

Detergents* <sup>1</sup> Concentrations (ppm)	CTAB* <sup>2</sup>		Nonipôru S-40			Growth responses* <sup>1</sup> Kation G-50			Nyûpôru PE-64			Rebon 15				
	10	100	1000	10	100	1000	10	100	1000	10	100	1000	10	100	1000	
<i>Aeromonas punctata</i> No. 15	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	10,16,54,
<i>Aeromonas sp.</i> No. 20-22	+++	-	-	+++	+	±	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	20-23
<i>Vibrio fischeri</i> No. 61	+++	-	-	+++	+	-	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	51
<i>Vibrio sp.</i> No. 20-14	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	20-13
<i>Pseudomonas sp.</i> No. 31	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	20-18
<i>Pseudomonas tp.</i> No. 22	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	
<i>Pseudomonas sp.</i> No. 7	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	8
<i>Pseudomonas sp.</i> No. 20-1	-	-	-	+++	+	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	57
<i>Alcaligenes faecalis</i> No. 14	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	20-15 20-28
<i>Alcaligenes faecalis</i> No. 20-27	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	20-21
( <i>Achromobacter</i> ) No. 20-19	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	

\*<sup>1</sup> Each symbol means that: - is 0-20% growth; ± is 20-50% growth; + is 50-75% growth; ++ is 75-90% growth and +++ is 90-100% growth in comparison with the respective blank. Shaking cultivation was carried out in the isolation-medium at 30°C.

\*<sup>2</sup> Cetyl-trimethyl-ammonium bromide.

Table 4. Growth responses of the sea-water-activated sludge-bacteria to various detergents at various concentrations

Detergents (ppm)	Growth responses*								
	<i>Aeromonas punctata</i> No. 15			<i>Pseudomonas</i> No. 7			<i>coryneform bacteria</i> No. 41		
	10	100	1000	10	100	1000	10	100	1000
LAS	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
Sandetto LTD	+++	+++	+++	++	+	+	+++	-	-
Nonipōru S-40	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
Sanmorin OT-70	+++	++	±	+++	++	++	±	±	-
Kation G-50	+++	++	-	++	-	-	-	-	-
Rebon TM-16	+++	++	-	++	-	-	-	-	-
Nonipōru 85	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	-	-
Nonipōru D-160	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	++
Emarumin 70	++	++	++	+++	+++	++	+	-	-
Nyūpōru PE-64	++	++	+	+++	++	++	+++	+++	+++
Ionetto DO-400	++	++	±	++	++	±	+++	+++	+
Ionetto S-20	+++	++	++	++	+	+	+++	+++	±
Purofan EX-24	+++	+	±	++	++	±	+	-	-
Rebon 101 H	+++	+++	++	++	++	+	+++	-	-
Rebon 15	+++	+++	-	++	++	-	-	-	-

\* Each symbol means that: - is 0-20% growth; ± is 20-50% growth; + is 50-75% growth; ++ is 75-90% growth and +++ is 90-100% growth in comparison with the respective blank. Shaking cultivation was carried out in the isolation-medium at 30°C.

に界面活性剤の影響がなければ、処理能・沈降能も正常時と変わらないものと判断出来るからである。結果は Table 5 に示したとうりである。呼吸についてももっとも影響が大きいのはカチオン系界面活性剤で、この他、500 ppm の高濃度だがアニオン系のサンデット LTD とノニオン系のイオネット DO-400 もかなり強力な細菌の呼吸阻害作用を示している。またとくにカチオン G-50 に対して 25 ppm 以下ならば、海水活性汚泥中常在性の高い *flavobacteria* の呼吸は大きな影響を受けていないが、*Aeromonas* と一部の *Pseudomonas* は決定的な影響を受けている。したがって呼吸に対するカチオン G-50 の影響は生育に対する場合とは異なった傾向を示すもので、たとえば、カチオン G-50 を 10 ppm 程度ならば環境制限因子として使用しても海水活性汚泥の処理能にはあまり急激な変化はおきないだろうと思われる。

次に、以上の結果の集約されたものとして界面活性剤の海水活性汚泥の呼吸に及ぼす影響を確かめた。これは海水活性汚泥の微生物相全体に対する界面活性剤の影響とみなすことができる。まず、生物酸素モニターの測定条件として測定時の海水活性汚泥量の検討を行ったところ、SV 13% 以下ならば測定し易いということがわかった (Table 6)。したがってこの条件で界面活性剤 500 ppm に対する海水活性汚泥の呼吸を

測定した。Table 6 に示すようにカチオン系界面活性剤であるカチオン G-50、レボン TM-16 および両性界面活性剤のレボン 15 の 3 種以外の界面活性剤は 500 ppm でも海水活性汚泥の呼吸には著しい影響を与えてはいない。一方、カチオン G-50 は 10 ppm、レボン 15 なら 12.5 ppm およびレボン TM-16 では 7.5 ppm でもかなり海水活性汚泥の呼吸は影響を受けているらしいことが明らかとなった。界面活性剤を有効な環境制限因子とするには作用の特異性は認め難いが、細胞壁がない原生動物と、外膜は界面活性剤で破壊され易いがさらに外膜の外側に多糖質のバリアーをもっているグラム陰性細菌とでは、適当な界面活性剤とその濃度を選択すれば原生動物類にだけ特異的に作用させることも可能であるように思われる。このため海水活性汚泥の呼吸がある程度は影響を受けるが、海水活性汚泥の主たる細菌相には影響のほとんどない界面活性剤をこれにあてることのできるものとおもわれる。

#### 4. 米麴甘藷仕込焼酎蒸溜廃液の連続処理

界面活性剤の流下実験に先立ち米麴甘藷仕込焼酎蒸溜廃液の処理条件の検討を行った。まず蒸溜廃液を海水で 60 倍希釈して COD 一定とし水量負荷可変で連続処理実験を行った。結果は Table 7 に示すとおりで、90% 以上の COD 除去率を得る条件は COD 負荷量 0.64 kg/m<sup>3</sup>/day 以下、水量負荷 1.7m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/day 以

Table 5. Effects of various detergents on the respiration of the sea-water-activated sludge-bacteria

Bacterial strains	Cell concentration of the suspension, mg/ml (dr.w.)	50% Oxygen consumption time for endogenous respiration, subtracted that of control from, (A), min.	Ratio of 50% oxygen consumption time in presence of a detergent to A, %*2			
			anionic	cationic	nonionic	amphoteric
<i>Aeromonas punctata</i> No. 15	0.719	9.0				
<i>Alcaligenes faecalis</i> No. 14	1.230	19.1				
<i>Corynebacterium coryneform</i> bacteria No. 41	1.196	31.6				
<i>Corynebacterium coryneform</i> bacteria No. 72	0.886	49.8				
<i>Flavobacterium</i> No. 40	0.925	31.5				
<i>Flavobacterium</i> No. 56	0.783	33.9				
<i>Pseudomonas</i> sp. No. 7	0.553	6.0				
<i>Pseudomonas</i> sp. No. 76	0.566	18.4				
<i>Pseudomonas</i> sp. No. 20-1	1.985	34.0				
unknown No. 81	1.333	17.0				
			Sanmorin OT-70*1			
			Sandetto LTD*1			
			Noniporu S-40*1			
			250 ppm			
			LAS : 25 ppm			
			Kation G-50:			
			2.5 ppm			
			7.5 ppm			
			25 ppm			
			50 ppm			
			200 ppm			
			Rebon TM-16:			
			5 ppm			
			25 ppm			
			5 ppm			
			25 ppm			
			25 ppm			
			Emarumin 70*1			
			Ionetto S-20*1			
			Ionetto DO-400*1			
			Noniporu 80*1			
			Noniporu D-160*1			
			Nyuporu PE-64*1			
			Purofan EX-24*1			
			Rebon 15:			
			25 ppm			
			Rebon 101 H*1			

\*1 Detergent concentration : 500 ppm.

\*2 Abbreviation of ratios: -100% to -200%, 1-; -200% to -400%, 2-; -400% to 1,000%, 3-; less than -1000, 4-.

Table 6. Effects of various detergents on the respiration of the sea-water-activated sludge

Activated sludge samples	50% Oxygen consumption time for endogenous respiration, from which that of control was subtracted, (A), min.	Oxygen consumption for 5 min., %		Ratio of 50% oxygen consumption time in presence of a detergent to A, %*2 (Oxygen consumption for 5 min., %)			
		control	endogenous	anionic	cationic	nonionic	ampho-teric
Sea-water activated sludge	18.5	36	10	Sanmorin OT-70* Sandetto LTD* Noniporu S-40*	Rebon 15: 25 ppm 20 ppm 15 ppm 10 ppm 5 ppm Kation G-50: 25 ppm 7.5 ppm 25 ppm	Emarumin 70* Ionetto S-20* Ionetto DO-400* Nonipôru 80* Nonipôru D-160* Nyuporu PE-64* purofan EX-24*	Rebon 101 H*
Sea-water activated sludge, SV 5.5%	32.0	31	6		99 72 63 59 36 (30) (15) (13) (12) ( 9)		
Sea-water activated sludge, SV 6.5%	29.7	30	7		74 51 (16) (11)	37 13 ( 9) ( 7)	

\* Detergent concentration : 500 ppm.

Table 7. Continuous treatments of the distiller's slops of rice-Koji-sweet potato-Shikomi-Shôchû by the sea-water-activated-sludge under the conditions of various hydraulic loadings

COD in the influents (ppm)	Amount of flow (1/day)	Hydraulic loading ( $m^3/m^3/day$ )	COD loading ( $kg/m^3/day$ )	SVI	Remaining COD (ppm)	COD removal (%)
0 (sea-water)	9.2	1.036	0.000	75		—
378	4.4	0.493	0.186	71	21	95
	10.7	1.197	0.453	146	63	83
	12.0	1.344	0.508	74	36	91
	15.1	1.695	0.639	61	36	91
	20.8	2.332	0.880	68	68	82
	21.5	2.411	0.910	115	114	70

Table 8. Continuous treatments of the distiller's slops of rice-Koji-sweet potato-Shikomi-Shôchû by the sea-water-activated-sludge under the conditions of various COD concentrations in the influent

COD in the influent (ppm)	Amount of flow (1/day)	Hydraulic loading ( $m^3/m^3/day$ )	COD loading ( $kg/m^3/day$ )	SVI	Remaining COD (ppm)	COD removal (%)
99	8.6	0.968	0.096	93	14	96
151	8.7	0.979	0.148	256	22	85
200	9.0	1.013	0.203	271	18	91
303	9.1	1.024	0.310	251	32	89
402	9.1	1.019	0.513	100	24	94
503	9.6	1.074	0.432	142	91	82

下であった。次に、蒸溜廃液を海水で希釈し6通りのCOD濃度の流下用の希釈廃液を調製、水量負荷を一定として連続処理実験を行った。結果はTable 8に示した。COD負荷量 $0.51 kg/m^3/day$ 以下ならばCOD除去率はほぼ良好であったが、SVIが200を越えて沈降性が不良になった点で問題が残った。これは処理中の曝気槽内の水温が $14^{\circ} \sim 20^{\circ}C$ の間で変化したことと、一連の連続した実験のためにリン不足の影響があらわれたものと判断している。

##### 5. 界面活性剤流下連続処理

前報<sup>9)</sup>でのべたように、蒸溜廃液を海水活性汚泥で連続処理中に *Hypotrachae* を中心とした原生動物が海水活性汚泥を蚕食して沈降性を不良にする。ここで連続処理で出現する原生動物類を低濃度の界面活性剤を環境制限因子として除去することを検討した。まず、米麴甘藷仕込焼酎の蒸溜廃液を海水で希釈して150 ppmとし、カチオン G-50 を加えながら水量負荷 $1.0 m^3/m^3/day$ で連続処理した。結果はTable 9

Table 9. Continuous treatments of the distiller's slops of rice-Koji-sweet potato-Shikomi-Shôchû by the sea-water-activated-sludge in presence of Kation G-50 at the concentration of 10 ppm\*

Kation G-50 added (ppm)	Treatment time (hour)	Hydraulic loading ( $m^3/m^3/day$ )	COD loading ( $kg/m^3/day$ )	SVI	Remaining COD (ppm)	COD removal (%)	Kation G-50 (ppm)
0	21	0.966	0.144		12	86	
	44.5	1.005	0.150		32	78	
	68	1.004	0.150	152	34	77	
10	21	1.010	0.150		40	73	<3
	44.5	1.037	0.155		30	80	<3
	68	1.036	0.154	136	48	68	<3

\* The starting SVI was 205.

The COD in the influent was 149 ppm.

The assay of Kation G-50 was carried out by the penicillin cup-method.



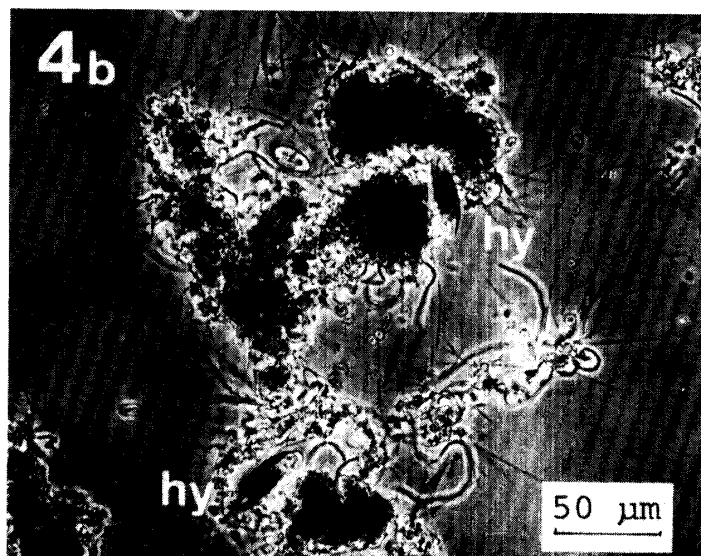
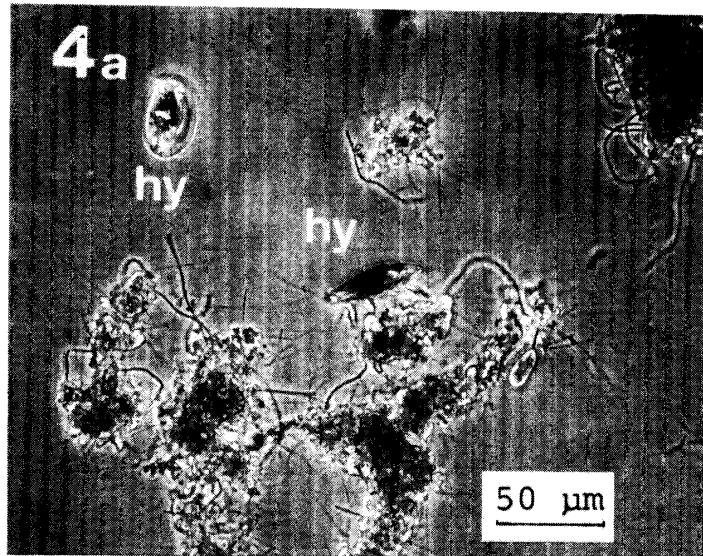
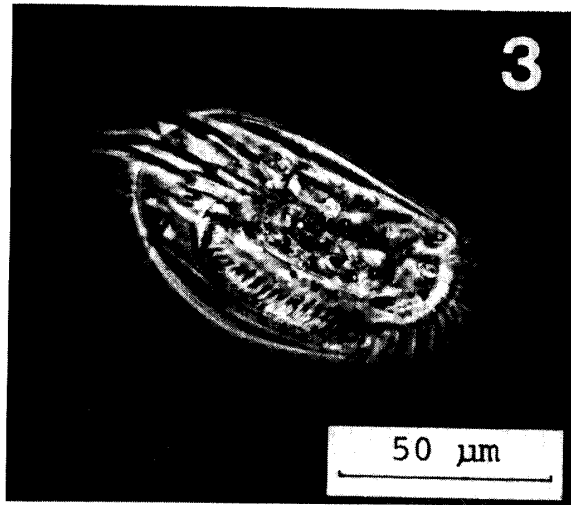


Photo 4a and 4b. *Hypotrichae*, eating greedily flocs of the sea-water-activated sludge.

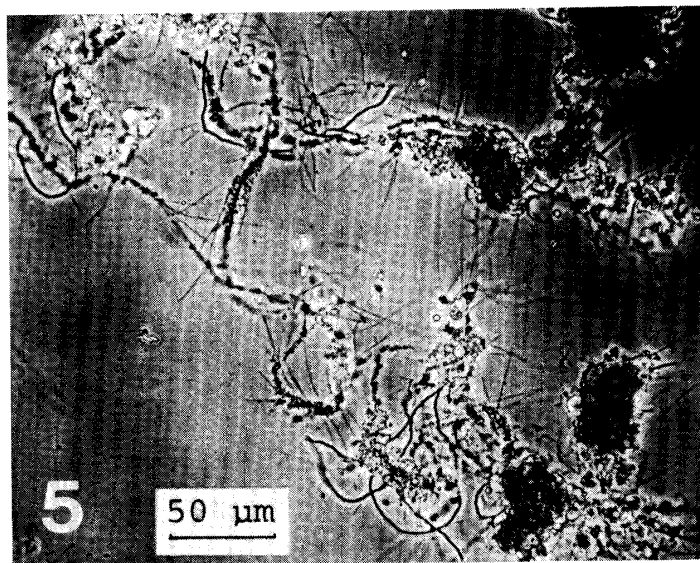


Photo 5. A terrible sight of flocs, that *hypotrichae* ate greedily.

に示したようにカチオン G-50 を 10 ppm 流下の場合、68時間で処理水などに多少差が認められるようになったので、カチオン G-50 の流下時間はこの程度が限度であろうと思われる。カチオン G-50 の作用状況を顕微鏡で観察したところ、*Hypotrichae, ciliata* など (Photos. 3, 4 および 5) が対照であるカチオン G-50 無添加槽では多数認められた。カチオン G-50 流下槽ではスカム中にはある程度の原生動物が観察できたが混合液中にはほとんど認められなかった。処理水中に残留するカチオン G-50 は定量の下限の 3 ppm 以下であった。(Table 10).

次に米麴米仕込焼酎の蒸溜廃液の連続処理実験には界面活性剤としてカチオン G-50 と LAS を使用した。まず、LAS の場合は Table 11 に示すように処理時間 2 日目では処理能が幾分低下するが、海水活性汚泥を

蚕食する *Hypotrichae* が一時的に姿を消した。しかし 3 日目には COD 除去率が 90% 台に回復し、Table 12 に示すように、回復とともに再び *Hypotrichae* の増殖が観察された。処理水中の LAS をペニシリンカップ法で測定したところ流下した LAS の少なくとも 70% は除去されたものと判断出来た。一方、米麴米仕込焼酎蒸溜廃液の連続処理でカチオン G-50 を 10 ppm 流下した場合は Table 13 に示すように COD 除去率について対照が 90% であるのに対しそれが 80% 台に低下し、処理期間内では回復の兆しは認められなかった。また、6 日間処理後の SVI はバルキング気味の対照と比較してむしろ良好で適正範囲に入っており、この点、海水活性汚泥の改良剤として使用することが可能であるようにおもわれる。(Photo 2) この結果の内容も Table 14 に示すように対照では原生

Table 10. Occurrences of *ciliata* in the sea-water activated sludge in presence/absence of the detergent Kation G-50 in the continuous treatments of the distiller's slops of rice-Koji-sweet-potato-Shikomi-Shōchū

		Occurrences of <i>protozoa</i>			SVI	COD removal (%)
		<i>Hypotrichae</i>	<i>Lionotus-like ciliata</i>	<i>Paramecium sp.</i>		
In presence of Kation G-50	aeration tank	±	±	+	136	68
	scum	±	—	—		
Control (in absence of Kation G-50)		+++	++	++	152	77

Table 11. Continuous treatments of the distiller's slops of rice-Koji-rice-Shikomi-Shôchû by the sea-water-activated sludge in the presence of LAS (linear alkylbenzenesulfonate) at the concentration of 10 ppm\*

LAS added (ppm)	Treatment time (day)	Hydraulic loading (m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /day)	COD loading (kg/m <sup>3</sup> /day)	SVI	SV (%)	MLSS (ppm)	Remaining COD (ppm)	COD removal (%)	LAS in the effluent (ppm)
0	0			80	12	1500			
	1	1.06	0.320				22	93	
	2	1.11	0.324	107	16	1490	21	93	
	3	1.09	0.325				24	92	
	4	1.10	0.326				24	92	
	5	1.10	0.327				24	92	
	6	1.10	0.327	91	15	1653	24	93	
10	0			84	12	1430			
	1	1.06	0.319				54	82	6
	2	1.05	0.317	99	14	1360	69	77	4
	3	1.08	0.319				26	91	0
	4	1.09	0.321				24	92	4
	5	1.09	0.321				22	93	3
	6	1.08	0.322	98	14	1383	22	93	3

\* COD of the influent : 300 ppm.

The assay of LAS was carried out by the penicillin-cup method.

Table 12. Occurrences of *protozoa* in the sea-water-activated sludge in presence/absence of the detergent LAS (linear alkylbenzenesulfonate) in the continuous treatments of the distiller's slops of rice-Koji-rice-Shikomi-Shôchû

LAS added (ppm)	Treatment time (day)	Occurrences of <i>protozoa</i>			COD removal (%) <sup>o</sup>
		<i>Hypotrichae</i>	<i>Paramecium</i> sp.	<i>monads</i>	
0	2	++	+++	++	93
	3	++	++	++	92
	4	+++	+++	+	92
	5	+++	+++	+++	92
	6	+++	+++	+++	93
	10	2	(+)	-	-
3		++	+++	++	91
4		+++	+++	-	92
5		++	-	+	93
6		+++	+++	++	93

動物類の増殖が著しいのに対して、カチオン G-50 流下では *Paramecium* 類を除いて少なくとも実験期間は消滅したままであった。これまで海水活性汚泥の沈降能または処理水の分離能の悪化には放線菌類<sup>9)</sup> が関与しているものと判断して来たが、さらに、以上の結果からは、あるいは原生動物類が海水活性汚泥を過度に蚕食することによってフロックの増殖が阻止されるのも一因であることが明らかになった。つまりこれらの原生動物数を界面活性剤の使用で制御し、海水活性汚泥の沈降性を良好な状態にまで回復させることも可能であることを示すものである。このためには、10 ppm とはいえ処理能にも影響があることから、日

数を例えば3日ぐらいい限って流下することも必要ではないかと思う。また処理水中に残留するカチオン G-50 は初期には流出量が多いが、3日を過ぎると 5 ppm 以下と低くなっている。

以上の連続処理実験で界面活性剤流下にともない、原生動物相に大きな変化があらわれたが、このことが海水活性汚泥細菌相に界面活性剤の直接の影響に加えてもう一つの変化をうながす動機になるであろう。この点を明らかにするため、海水活性汚泥の微生物相を界面活性剤流下の場合と対照の場合とを比較しながら検討した。分離はスポット寒天平板法<sup>2,7)</sup> によった。まず、LAS 10 ppm 流下の場合の結果は Table 15 に

Table 13. Continuous treatments of the distiller's slops of rice-Koji-rice-Shikomi-Shōchū by the sea-water-activated sludge in the presence of Kation G-50 (benzalkonium chloride) at the concentration of 10 ppm\*

Kation G-50 added (ppm)	treatment time (day)	Hydraulic loading ( $m^3/m^3/day$ )	COD loading ( $kg/m^3/day$ )	SVI	SV (%)	MLSS (ppm)	Remaining COD (ppm)	COD removal (%)	Kation G-50 in the effluent (ppm)
0	0			156	13	836			
	1	1.06	0.333				20	93	
	2	1.11	0.333				18	94	
	3	1.11	0.333				20	93	
	4	1.12	0.336				16	95	
	5	1.13	0.336				14	95	
	6	1.11	0.333		286	36	1260	14	95
10	0			156	13	830			
	1	1.08	0.336				36	88	<3
	2	1.12	0.336				57	81	<3
	3	1.12	0.336				54	82	<3
	4	1.13	0.339				46	85	<3
	5	1.12	0.339				44	86	<3
	6	1.12	0.336		138	13	944	40	87

\* COD of the influent : 300 ppm.

The assay of Kation G-50 was carried out by the penicillin-cup method.



Photo 5. Thirty-minute precipitation of the sea-water-activated sludge after continuously treating of diluted Shōchū-distiller's slops containing Kation G-50 at 10 ppm (right) and control (left).

示した。これによると対照では *Alcaligenes faecalis*-*Alcaligenes sp.* が LAS 流下で消失してしまう点が著しい。一方 LAS 流下で比重の増すグループは *Aeromonas sp.*, *Vibrio sp.* および *Pseudomonas spp.* で LAS 流下にもなって細菌相の重心が移動したことを示している。また、カチオン G-50 10 ppm 流下の

場合の結果は Table 16 に示した。前の実験で *Pseudomonas spp.* は一部を除いて生育・呼吸とも影響を受けにくい結果が出ていたが、ここで得られた結果もそれと符合する。また、*Alcaligenes faecalis*-*Alcaligenes sp.* は生育・呼吸ともカチオン G-50 に感受性が高いという結果であったが、カチオン G-50

Table 14. Occurrences of *protozoa* in the sea-water-activated sludge in presence/absence of the detergent Kation G-50 (benzalkonium chloride) in the continuous treatments of the distiller's slops of rice-Koji-rice-Shikomi-Shōchū

Kation G-50 added (ppm)	Treatment time (day)	Occurrences of <i>protozoa</i>			COD removal (%)
		<i>Hypotrichae</i>	<i>Paramecium sp.</i>	<i>monads</i>	
0	0	+	+++	++	
	1	-	++	+++	93
	2	-	+	++++	94
	3	+	+++	+++	93
	4	+	+	+++	95
	5	++	++	++	95
	6	+++	+++	++	95
10	1	-	(+)	-	88
	2	-	++	-	81
	3	-	+++	-	82
	4	-	+++	-	85
	5	+	++	-	86
	6	+	+	-	87

Table 15. Frequency of occurrence of the sludge-microorganisms in the sea-water-activated sludge acclimated to Shōchū-distiller's slops, containing linear alkylbenzene sulfonate (LAS) at 10 ppm

Colony-form	Isolates				Determination
	frequency	LAS-strains	frequency	control	
a-1	100	2-2, 2-3	100	2-2, (dp-3) 2-3 d-1w 2-2	<i>Aeromonas punctata</i>
a-2	100	1-3, 1-2	0		<i>Aeromonas sp.</i>
b-2	100	2-2	0		<i>Pseudomonas sp.</i>
d-3	100	1-2, 1-3	100	1-2	<i>Aeromonas sp.</i>
d-3'	0		100	3-2, 3-3 y-2 2-2	<i>Alcaligenes faecalis</i>
dp-3	0		100	2-1	<i>Aeromonas punctata</i>
dp-3'	0		100	1-3	<i>Aeromonas sp.</i>
dp-3, transparent	100	2-2	0		<i>Vibrio sp.</i>
y-1	12	3-2, 3-3	100	1-1, 2-3	<i>flavobacteria</i>
r-1	0		100	2-2, 2-1, 1-3	
br-1	0		100	1-2, 2, 2-2	

Table 16. Frequency of occurrence of the sludge-microorganisms in the sea-water-activated sludge acclimated to Shōchū-distiller's slops, containing benzalkonium chloride (G-50) at 10 ppm

Colony-form	Isolates				Determination
	frequency	G-50-strains	frequency	control	
d/b	100	A1, A3	100	b-2 B1, b' B2, b' B1, d/b B1, t/b B1	<i>Pseudomonas sp.</i>
b	100	A, t/b=b A1	100	d-5 B3	<i>Aeromonas punctata</i>
s	100	A2	100	B1	<i>Vibrio sp./ Aer. punctata</i>
d <sup>o</sup>	0		100	B1, b/d B3	<i>Alcaligenes sp./ Alc. faecalis</i>
r			100	B2	
y			100	B3	<i>flavobacteria</i>

流下で消失してしまったのはカチオン G-50 の直接の影響によるものとも受けとれる。しかし平板法による分離は所詮は相対的な多寡を示すものであって、普通、数の上で10の3桁少ない微生物群はとらえることができないので、あくまでどの微生物とどの微生物に微生物相の比重があるかを示すにすぎない。したがってこの場合も、カチオン G-50 が顕微鏡下直接原生動物を破壊することが確かめられているので、原生動物の嗜好性の高い餌となっていた細菌が、原生動物の消失にともない増加して来たものとも、また、カチオン G-50 に感受性の高い細菌がいち早く減少して感受性の低いものに重心が移動してしまったとの両様の判断ができる。この点を明らかにするため蛍光抗体法によって処理過程で海水活性汚泥中の代表的な常在細菌と思われる *Pseudomonas sp.* No. 7, *Aeromonas punctata* No. 15 および *flavobacteria* No. 56 を追跡したが、確認はえられなかった。

## 要 約

海水活性汚泥で焼酎蒸溜廃液の処理中、*Hypotrichae* を中心とする原生動物類が大量に増殖してフロックを蚕食し、このためフロックの瘦削や破壊がおきて、これが海水活性汚泥の沈降性の悪化の一因であった。この際、大量に発生している原生動物類を適当な界面活性剤を環境制限因子として使用して駆除することによって海水活性汚泥による焼酎蒸溜廃液を順調に行うことを目的とした。

1. 分析の結果、今回使用した米麴甘藷仕込焼酎と米麴米仕込焼酎の蒸溜廃液の COD (化学的酸素要求量) は約 23,000 ppm であった。また、COD : 全窒素 : リン比はそれぞれ 100 : 10 : 0.6~0.8 および 100 : 11 : 1.3 でいずれリンが適正範囲より少ない。

2. 界面活性剤の流下の流下条件を決定するため細菌の生育・呼吸および海水活性汚泥の呼吸に及ぼす界面活性剤の影響を検討した。細菌の生育についてはカチオン系界面活性剤の生育阻害作用が著しく、10 ppm でも被検細菌 64 株の半数で生育が認められなかった。一方、細菌および海水活性汚泥の呼吸については、カチオン系界面活性剤のカチオン G-50 (ドデシル・ジメチル・ベンジル・アンモニウム・クロリド) や CTAC (セチル・トリメチル・アンモニウム・クロリド) は 25 ppm 前後の濃度でも呼吸に著しく影響することが明らかになった。

3. 米麴甘藷仕込焼酎蒸溜廃液の連続処理条件を検討したが、水量負荷は 0.49~1.70 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/day および

COD 負荷量は 0.10~0.51 kg/m<sup>3</sup>/day の範囲内で良好であった。

4. 界面活性剤 10 ppm を流下しながら焼酎蒸溜廃液の連続処理を行った。カチオン G-50 3 日間の流下程度なら、原生動物類、とくに *Hypotrichae* はほとんど消失してしまうが、海水活性汚泥細菌相には劇的な影響はなく、活性汚泥の処理能もほぼ良好であった。一方、アニオン系の LAS (直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム) では *Hypotrichae* は除去できなかった。米麴甘藷仕込焼酎の蒸溜廃液の連続処理でカチオン G-50 流下によって微生物相におきた変化をみると、細菌相にもその重心の変化のあったことがわかった。とくに主要な相構成細菌の *Alcaligenes* がいち早く消失してしまった。以上の結果、界面活性剤で原生動物類を制御し、海水活性汚泥の沈降性を良好な状態にまで回復させることが可能であると判断できた。

謝辞 本研究の蛍光抗体の調製にあたり、御協力をいただいた本学農学部獣医学科の佐藤平二教授および大学院生の古賀久視氏に深く感謝するとともに、本研究で使用した多数の界面活性剤は三洋化成工業株式会社(京都市)から提供を受けたので、ここに記して深く謝意を表す。

## 文 献

- 1) 青峰重範・原田登五郎：土壤肥料学実験ノート，p. 26-29，養賢堂東京(1971)
- 2) 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，環境汚染物資の生物変換，汚染防除技術における微生物の生態，p. 109-123 (1980)
- 3) Tanabe, I.: Microbiological studies of the sea water activated sludge, *Microbiology for Environment Cleaning*, Scientific reports of the research project, "Environment Cleaning by Microorganisms, 1974-1977", 74-86 (1978)
- 4) Tanabe, I., Fujii, M., Kamimura, Y., Yoshii, S., Kuboyama, H., Nagata-Maehara, H., and Sonoda, T.: Studies on the Biological Treatment of the Shôchû-Distiller's Slops by the Sea-water distiller's slops by the Sea-water Activated sludge, *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, 15, 131-143 (1979)
- 5) 田邊幾之助・上村幸宏・吉井右・木佐木博・藤井正範：海水活性汚泥の微生物相。とくに従来法による常在微生物相について，鹿大農学術報告 No. 31, 33-39 (1981)
- 6) 田邊幾之助・木佐木博・原田元弘，川路博志：海水活性汚泥の微生物相，とくにフロックの構造的性について，鹿大農学術報告 No. 32, 87-94 (1982)
- 7) 田邊幾之助・木佐木博・原田元弘，川路博志：海水活性汚泥中，微生物の局存性の検討，鹿大農学術報告 No. 32, 95-100 (1982)
- 8) 田邊幾之助・木佐木博・園田登喜子・原田元弘，川路博志：各種処理条件下におかれた海水活性汚泥の処理能

- と微生物について, 鹿大農学術報告 No. 33, 77-82 (1983)
- 9) 田邊幾之助・永山純孝・中山孝志: 旧式焼酎(米麴米/生白糠仕込) 蒸溜廃液の海水活性汚泥による連続処理, 鹿大農学術報告 No. 33, 65-76 (1983)
- 10) 田邊幾之助・田実博美・真角孝則・上村幸宏・吉井右・久保山宏・前原哲勝・大林 見: 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)

### Summary

A big amount of protozoa, mainly *hypotrichae* multiplied on the way of treating the Shôchû-distiller's slops by the sea-water-activated sludge so much encroaches on the flocs of the sludge as to turn them into skin-thinned, or to make them broken into pieces; and this was assumed to be a cause of lessening the settling-capacity of the sea-water-activated sludge.

This investigation was carried out to find a way to get rid of the big amount of protozoa with a proper detergent, a circumstance-restricting agent and to regain the favorability of the sea-water-activated sludge process.

1. The amounts of chemical oxygen demands, or CODs of the distiller's slops of the rice-koji-sweet, potato-Shikomi-Shôchû and of the rice-koji- rice-Shikomi-Shôchû used in the analyses were fixed to be approximately 23,000 ppm; and the rate of COD: total nitrogen: total phosphorus were 100:10:0.6-0.8 and 100:11:1.3, respectively, which were below the ranges of phosphorus desirable for the proper treatment of the waste by the activated sludge process.

2. For the purpose of clarifying some conditions favorable for adding the detergents to the mixed liquors of the sea-water-activated sludge and the waste-water, some investigations were carried out on the influences of some detergents upon the growth and respiration of sea-water-activated sludge-bacteria, and that of the sea-water-activated sludge. Remarkable bacterial growth-inhibitions were observed in the bacterial strains used, namely, half of those were unable to grow in the medium containing the cationic detergents at 10 ppm, and some drastic influences of such cationic detergents at 25 ppm as Kation G-50 (Dodecyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride) and CTAB (Cetyl-trimethyl-ammonium bromide) were noted upon the respiration of the sea-water-activated sludge-bacterial strains, and the sea-water activated sludge.

3. The ranges in which favorable continuous-treatment of the slops of rice-koji-sweet potato-Shikomi-Shôchû was carried out, were those of the hydraulic loading, fixed at 0.49 to 1.70 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/day and of the COD loading, at 0.10 to 0.51 kg/m<sup>3</sup>/day, respectively.

4. Continuous treatments of the Shôchû-distiller's slops of rice-koji-sweet potato-Shikomi, and of rice-koji-rice-Shikomi, were carried out with the addition of the detergent at 10 ppm to the mixed liquors. In the mixed liquors, most of the protozoa, especially *hypotrichae*, disappeared as the result of the 3-day-treatment, in which Kation G-50 was added; no drastic influence was noted on the sea-water-activated sludge-bacterial flora, and treating capacity was kept good, too. No exclusion of *hypotrichae* was brought about, even after the addition of an anionic detergent, LAS (linear sodium alkyl-benzene-sulfonate) to the mixed liquor at a concentration of 10 ppm. It was noted that by the addition of Kation G-50, the gravity-center of micro-flora, especially that of the bacterial flora was made to be shifting during the continuous treatment of the distiller's slops of rice-koji-rice-Shikomi-Shôchû. The disappearance of *Alcaligenes* spp. or the main constituents of the bacterial flora of the sea-water-activated sludge was induced by the action of the detergent at the early stage of the treatment. Hence a conclusion that the recovery of the settling capacity of the sea-water-activated sludge to the previous favorable level was brought forth by this process.