酪農雑排水処理施設への微生物保持担体としての球状パーライトの投入効果

田中康男¹・館野浩一^{2a}・永松保久^{2b}・山本正己³・柴崎能誌³・山下恭広¹

¹ (独)農研機構・畜産草地研究所, つくば市 305-0901

² 全国農業協同組合連合会, 東京都千代田区 100-6832

³ 中国工業株式会社, 呉市 737-0192

(2013. 7. 25 受付, 2013. 10. 7 受理)

要 約 直径 1.5~3 mm の球状パーライトを微生物保持担体として活性汚泥曝気槽に投入した場合の効果について, 2 カ所の酪農雑排水浄化用表面曝気回分式活性汚泥法施設 (施設 1: 容積 50 m³, 施設 2: 容積 30 m³) で検討した. パーライトは 2012 年 11 月 (一部は 12 月) に, 見かけ容積として曝気槽容積の 10% 添加し, 投入前の約 1 ヶ月半に 5~6 回, 投入後の約 1 ヶ月間に 6~7 回採水し水質等の分析を行った. 曝気槽混合液中の粒状および粉末状のパーライトの合計濃度は投入後一旦高まったが, その後は徐々に低下した. 曝気槽はインペラーによる表面曝気方式であったため, パーライトがインペラーにより破砕され, 処理水とともに流出したと推測された. 投入後は両施設とも水温が 18℃ から 12℃ まで徐々に低下したが, 施設 1 では, 全窒素および全無機態窒素の除去率が 80% から 95% 程度にまで徐々に上昇した. 施設 2 では, 全窒素および全無機態窒素除去率が 68~77% に維持された. また, 投入後には, 施設 1 では NO₂⁻-N, NO₃⁻-N の両方が, また施設 2 では NO₂⁻-N が顕著に上昇し, 硝化活性の上昇が示唆された. 粒状および粉末状パーライトの合計重量が MLSS に占める割合と単位汚泥量あたりの *Thauera* 属 DNA コピー数との間には有意な相関がみられた. よって, *Thauera* 属の菌体量増加にパーライトが影響を及ぼした可能性が示唆された. 以上の結果より, パーライト投入が窒素除去に効果を及ぼしたことが示唆された.

日本畜産学会報 85 (1), 41-49, 2014

畜舎汚水の処理については, 活性汚泥法を基盤とする各種の処理技術が普及している. 活性汚泥法は, 運転調整を確実にすれば優れた浄化性能を発揮する. しかし, 低温期には硝化細菌の維持が困難となり, 窒素除去率が低下する場合が多い. 最近では水質汚濁防止法による硝酸性窒素等の暫定規制値が 3 年ごとに見直され, 今後 100 mg/L の一律基準値まで下げられる可能性もある. このため, 低温期にも一定の窒素除去能を維持することが重要となる. 低温期の活性汚泥法の窒素除去能を高める手法として, いくつかの選択肢があるが, 微生物保持用担体を曝気槽に投入して硝化細菌量を増やす手法もある. また, 担体を利用するのであれば, 汚泥量の微妙な調整が必要な活性汚泥法の代わりに, 担体上の微生物膜のみで浄化を行う方法に変更すれば, 浄化対応がより容易になる可能性もある. 押田ら (2012) は, 維持管理の容易さについて, 活性汚泥法は「難」, 生物膜法は「中」とし, 生物膜法の方が維持管理面で有利としている. また, 簡易曝気施設といった, 浄化能力の不十分な施設の能力向上を目的とした担体利用も, 畜産分野では考慮に値する.

担体としては, 合成樹脂, セラミック, 炭化物など多くの選択肢があるが, 第一の条件として, 投入により槽内の閉塞が生じないことが重要である. また, 低価格で, かつ投入した際に曝気による流動が容易なものが望ましい. さらに, 余剰汚泥に混入した際に汚泥の農地利用に支障を与えない素材であることも重要である.

上記の観点から, 我々は, 粒状パーライトを担体として曝気槽に投入する手法の検討を, 実験室規模およびベンチスケール装置によって続けてきた (田中ら 2010, 2011). パーライトは, 園芸・土木分野で大量に使用されている多孔性の無機質資材であり, 入手は容易で, 単価も微生物保持用として販売されている担体に比べれば安価である. また, 非常に軽量のため, 運搬や投入が容易である. さらに, 畜糞の堆肥化の副資材としての利用例もあり, 農地に移行した場合の悪影響の懸念もない. これらの利点に加えて, 実験室規模での検討ではあるものの, 活性汚泥にパーライトを添加した場合には, 好気性環境下での脱窒も生じ, *Thauera* 属細菌種がその反応に関与している可能性が示唆されている (Yamashita ら 2011).

現所属: ^a JA 東日本くみあい飼料株式会社, 太田市 373-0015

^b JA 三井リース株式会社, 東京都品川区 141-0022

連絡者: 田中康男 (fax: 029-838-8606, e-mail: osuya@affrc.go.jp)

今回は、特に低温下での窒素除去を主目的とし、酪農排水の回分式活性汚泥法浄化施設 2 カ所にパーライトを投入し、秋から冬にかけて水質の変化を追跡した。また、パーライト投入前後で活性汚泥を採取し、*Thauera* 属の遺伝子数の定量を行い、本細菌属の増殖への影響の有無についても検討した。

材料および方法

1. 試験施設の概要

千葉県内の 2 軒の酪農農家に設置された 2 カ所の回分式活性汚泥処理方式の排水浄化施設（施設 1 (Facility 1)、施設 2 (Facility 2)）（図 1）で試験を実施した。これらの施設の曝気は表面機械曝気方式で、攪拌用インペラーの下部には槽内液の循環を効率よく行うための対流筒が設置されている。

施設 1 の農場の飼養規模は搾乳牛 70 頭の繋飼いで、糞の搬出にはバークリーナーを使用。汚水処理量は $4.2 \text{ m}^3/\text{日}$ 、希釈水（地下水）量は $16.8 \text{ m}^3/\text{日}$ である。曝気槽容積は 50 m^3 で、インペラーおよび対流筒は 5 カ所に設置されている。施設 2 の農場の飼養規模は搾乳牛 37 頭の繋飼いで、糞の搬出は手掻きである。汚水量は $2.2 \text{ m}^3/\text{日}$ 、希釈水（地下水）量は $9.8 \text{ m}^3/\text{日}$ である。曝気槽容積は 30 m^3 で、インペラーおよび対流筒は 3 カ所に設置されている。

処理水放流用水中ポンプは、目合 2mm のポリエチレン製ネット（ダイオ化成製、東京）で包み、パーライトの流出を防いだ。毎日 1 回曝気を停止し活性汚泥が沈降した後に放流ポンプが起動し、一定水位に液面が低下するまで処理水を排出した。汚水の投入はこの後に貯留槽から水中ポンプで行った。

2. パーライトの仕様

投入パーライトは、黒曜石系（太平洋マテリアル製 3 号、粒径 $1.5 \sim 3 \text{ mm}$ 、標準容重 0.09 kg/L 、東京）（図 2 上）を

Figure 2 Perlite used for the experiment and liquid surface of aeration tank after adding perlite.

Figure 1 Schematics of dairy farming wastewater treatment facilities where perlite added experiment was carried out.

Table 1 Reagent and primer for real-time PCR

	Name	Sequence
Forward primer	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
Reverse primer	Thau832	TGCATTGCTGCTCCGAAC
QProbe	Bac526-535 (5LNA) QP-G_f	CAGCAGCcgc

Table 2 Composition of PCR reagent and volume of reagent and sample

Component	Concentration
10 x Titanium Taq PCR Buffer (Clontech)	1 x
dNTP PLUS (Roche)	0.2 mM
27F	0.15 μ M
Thau832	0.5 μ M
Bac526-535 (5LNA) QP-G_f	0.05 μ M
Uracil DNA Glycosylase (Roche)	0.01 units/ μ L
50 x TITANIUM Taq DNA Polymerase (Clontech)	1 x
Reagent volume	18 μ L
Sample volume	2 μ L
Total volume	20 μ L

用いた。投入量は見かけ容積として 10%とした。ただし、投入当初はパーライトが水面に浮上し(図 2 下)、施設上部のマンホールからあふれる状況であった。このため、1 回で全量投入はできず、最初の投入後にパーライトが汚水になじんで流動する状況になってから追加投入した。

3. 試験の期間

試験は 2012 年 9 月から同年 12 月までの約 4 カ月間行った。この期間の前半はパーライトを投入せずに原水及び処理水の水質の把握を行い、その後パーライト投入を行い、同様に水質の変化を把握した。それぞれの農場でのパーライトの投入日と投入量は以下のとおりである。

施設 1 : 11 月 7 日 4 m³、12 月 5 日 1 m³。

施設 2 : 11 月 15 日 2.4 m³、11 月 20 日 0.6 m³。

4. 分析方法

1) 水質などの分析

槽内混合液の水温および溶存酸素 (DO) 濃度は、隔膜形ガルバニ電池式溶存酸素計 (飯島電子工業製、ID-100、愛知) によって測定した。pH は、ガラス電極法によって測定した。浮遊物質 (SS) は、下水試験方法 (日本下水道協会 1997) により測定した。生物化学的酸素要求量 (BOD) は、Hach Company (Loveland, CO, USA) 製自動測定装置 (BOD Trak) によって測定した。なお、測定に際しては、硝化抑制剤 (2-chloro-6- (trichloromethyl) pyridine) を添加した。亜硝酸態窒素 (NO₂⁻-N)、硝酸態窒素 (NO₃⁻-N) は、陰イオンクロマトグラフィー (東ソー製 IC-2010 (Super IC-Anion HS カラム)、東京) により、またアンモニウム態窒素 (NH₄⁺-N) は、自動式装置 (ゲルハルトジャパン製ベーパデス 50s オートサンプラー、

Table 3 Real-time PCR condition

	Temp.	Time	Acquisition
Hot start	95 °C	120 sec	NONE
PCR (50cycle)	95°C	10 sec	SINGLE
	55°C	15 sec	SINGLE
	72°C	40 sec	NONE
Melting analysis	95	15 sec	NONE
	45	15 sec	NONE
	↓	0.2°C /sec	
	98	0 sec	CONT

東京) を持いた蒸留滴定法によりそれぞれ測定した。NO₂⁻-N、NO₃⁻-N および NH₄⁺-N の合計を全無機態窒素 (TIN) とし、計算によって求めた。全窒素 (TN) は、島津製作所製 TOC-VN (京都) で測定した。

なお、原水の水質値については、希釈前の流入汚水の測定値を、希釈水の混合倍率で除して求めた。

曝気槽混合液の活性汚泥浮遊物質 (MLSS) と活性汚泥有機性浮遊物質 (MLVSS) の濃度は、混合液 0.5~1 L を 20 メッシュ (目開き 0.840 mm) の篩に通し、粒状のパーライトを分離した後、通過液 50 mL を分取し、下水試験方法 (日本下水道協会 1997) により測定した。また、MLSS と MLVSS の差を活性汚泥無機性浮遊物質 (MLISS) として算出した。篩に残った粒状パーライトの重量は、パーライトを蒸発皿に移し、105°C で乾燥後、さらに 600°C 電気炉で 30 分加熱し、残留物の重量を測定し、混合液 1 L あたりに換算して粒状パーライト重 (MLPSS) とした。

2) *Thauera* 属の遺伝子数定量

施設から採取した曝気槽混合液 40 mL を 5000×g で 10 分間遠心し、上澄液を捨てて残った汚泥 0.2 g (湿重) より 50 μ L の DNA 抽出液を得た。DNA 抽出は、市販の UltraClean Soil DNA kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った。得られた DNA 抽出液について、*Thauera* ゲノム DNA に特徴的な配列を鋳型として、QProbe-PCR 法によるリアルタイム PCR 法により、DNA コピー数の定量を行った。なお、サマールサイクラーには Rotor-Gene (QIAGEN, 東京) を使用し、解析ソフトウェアは Rotor Gene Software を用いた。分析条件の詳細は、表 1, 2, 3 に示した。

結果および考察

曝気槽の水温は、パーライト投入前は 18~24℃程度であったが、投入後は 18℃から 12℃程度まで連続的に低下した (図 3)。曝気槽の DO は、施設 1, 施設 2 とともに、11 月中旬までは 2~3 mg/L でほぼ安定していたが、その後施設 1 では 5.5~6.5 mg/L に、また施設 2 では 3~4.5 mg/L 程度に上昇した (図 3)。この上昇は、水温低下による飽和 DO 濃度の上昇により、酸素の溶解効率が高まったことが要因の一つと推定される。

希釈前の、汚水および処理水の pH の変化を、図 4 に示した。希釈前の汚水は、両施設ともおおよそ pH8.5 を

Figure 3 Changes in water temperature and dissolved oxygen (DO) concentration in mixed liquor of the treatment facilities. (black symbols are data after perlite addition)

Figure 4 Changes in pH of influent and effluent of the treatment facilities. (black symbols are data after perlite addition)

Figure 5 Changes in mixed liquor organic suspended solid (MLVSS), mixed liquor inorganic suspended solids (MLISS), mixed liquor particulated suspended solid (MLPSS), and estimated value of nominal perlite volume in the facility 1. (black symbols are data after perlite addition)

示した。施設 1 の処理水 pH は、パーライト添加前は 7.5 ～8 程度であったが、添加後は 6.5 ～7.5 程度に低下した。この低下は、後述のように、パーライト投入後に硝酸イオンが高まったためと推測される。施設 2 の処理水 pH は、7～7.5 でほぼ安定していた。

図 5（上）は、施設 1 における MLVSS, MLISS, および MLPSS の変化を示し、図 5（下）は MLISS のパーライト添加後の増加分と MLPSS の合計値からパーライトの見かけ容積を換算し曝気槽容積に対するパーセントで示したものである。添加前の MLVSS は約 3000 mg/L で安定していたが、添加後は 4000～500 の範囲で大きく変動した。この変動の理由は不明である。MLISS は、添加直後から高まり 1 ヶ月後にピークを示した後は低下傾向になった。したがって、添加パーライトは 1 ヶ月程度で粉砕と流出がかなり進んだと思われる。パーライトの見かけ容積換算値は、一旦 5% 程度まで高まったが、その後は低下した。投入当初に低かったのは、投入パーライトがまだ汚水に馴染まず、浮上している割合が多かったためと推測される。図 6 は、同じく施設 2 の変化である。MLSS, MLISS, およびパーライト見かけ容積の変化は、施設 1 とほぼ同様であった。見かけ容積は、やはり添加後約 1 ヶ月で 4% 程度まで高まった後に減少傾向を示した。今回の曝気槽は水面付近に設置されたインペラーの攪拌により曝気を行う

形式であったため、機械的な破砕強度が大きく、パーライトの早期の破砕につながったと推測される。散気方式の曝気槽では、破砕の状況がかなり異なる可能性がある。

BOD および SS の変化は、図 7 および図 8 に示した。両施設ともに、パーライト添加後は、処理水の BOD 値が低下傾向を示した。また、処理水の SS についても施設 2 では、パーライト添加後は低下傾向であった。パーライト付着微生物による生物学的分解能の増加と、放流水中ポンプに被せたネットによるろ過効果のいずれか、または両方が低下に寄与したと思われる。少なくとも、パーライト添加は、有機物除去性能に悪影響を与えなかったといえる。

施設 1 と施設 2 における $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の濃度および除去率の変化を図 9 に示した。原水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は、400～800 mg/L の範囲であった。施設 1 の除去率は、パーライト投入前には 50～90% の範囲で変動したが、投入後は 95% 以上を示す頻度が高まった。施設 2 での除去率は、投入前後ともおよそ 60～80% の範囲で変動した。

$\text{NO}_2^-\text{-N}$, および $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の変化は図 10 に示した。施設 1 では、パーライト投入後に $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ともに顕著に高まった。また、施設 2 では、パーライト投入後に $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の変化が見られなかったのに対し、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ は顕著に高まった。これらの結果より、施設 1 ではパーライト投入により硝化活性が高まり、施設 2 でも少なく

Figure 6 Changes in mixed liquor organic suspended solid (MLVSS), mixed liquor inorganic suspended solids (MLISS), mixed liquor particulated suspended solid (MLPSS), and estimated value of nominal perlite volume in the facility 2. (black symbols are data after perlite addition)

Figure 7 Changes in biochemical oxygen demand (BOD) of influent (after dilution) and effluent of the treatment facilities. (black symbols are data after perlite addition)

Figure 8 Changes in suspended solid of influent (after dilution) and effluent of the treatment facilities. (black symbols are data after perlite addition)

Figure 10 Changes in NO₂⁻-N and NO₃⁻-N concentration of influent (after dilution) and effluent. (black symbols are data after perlite addition)

Figure 9 Changes in NH₄⁺-N concentration of influent (after dilution) and effluent and NH₄⁺-N removal rate. (black symbols are data after perlite addition)

Figure 11 Changes in removal rates of total nitrogen and total inorganic nitrogen. (black symbols are data after perlite addition)

ともアンモニア酸化活性は高まったことが示唆された。

TN および TIN の除去率を図 11 に示した。施設 1 では、パーライト添加後 TN 除去率が徐々に上昇する傾向が見られた。この時期には水温が顕著に低下し、窒素除去に不利な状況であったことから、TN 除去率の上昇はパーライトの効果によると推測される。なお、TIN 除去率も同様な変化傾向を示したことから、この TIN 除去率の上昇は、ネットのろ過効果で有機性窒素除去率が高まったわけではなく、硝化・脱窒活性の増大に起因するものと推測される。施設 2 では、TN および TIN 除去率は、パーライト添加後一旦上昇した。その後は徐々に低下したものの、投入前と比較してほぼ同レベルであった。投入後の水温低下を勘案すれば、施設 1 と同様にパーライトが窒素除去関連微生物の活性上昇に効果を及ぼしたことが示唆される。

図 12 は、*Thauera* の DNA コピー数の測定結果である。

両施設ともに、パーライト添加後の値は、添加前より増大した。特に 12 月 17 日の上昇は顕著であった。MLSS 中に占めるパーライト重量（粉末も含める）の割合とコピー数との相関関係をみると、図 13 に示したように直線的な関係のあることが示唆された（危険率 1% で有意）。この結果は、パーライト（破碎された粉末も含む）に付着して *Thauera* が増殖したことを示唆する。一般に、*Thauera* は、活性汚泥中において主要な脱窒細菌の一つであることが推測されており（Seviour と Nielsen 2010）、さらに好気性脱窒能を有する *Thauera* 属菌株の存在も報告されている（Scholten ら 1999）。さらに、Seviour と Nielsen (2010) によれば、FISH-MAR 法による解析では、硝化・脱窒を実施している産業廃水実施施設の活性汚泥で、*Azoarcus* 属と *Thauera* 属が優占的であったとされ、それらの属の脱窒活性も確認されている。これらの知見に基づき、

Figure 12 Number of DNA copies of genus *Thauera* in the sludge of treatment facilities before and after addition of the perlite. (black bar represent the data after perlite addition)

Figure 13 Relationship between weight percent of perlite in MLSS and number of DNA copies of genus *Thauera*. (** $P < 0.01$)

Seviour と Nielsen (2010) は, *Azoarcus/Thauera* のコンプレックスは排水処理において広く出現する主要脱窒菌群であると推定している。これらの既往知見から, パーライト添加による *Thauera* の増加は, 脱窒促進に寄与したと推測される。

パーライトは, 粒径が 1.5~3 mm と小さく, 曝気を停止した場合にも沈降せずに浮上するものもある。したがって, 処理液とともに槽外に流出しないように, スクリーンやネットなどを利用して曝気槽からの流出を阻止することが不可欠となる。今回の試験では放流用水中ポンプに 2 mm 目合いのネットを被せる手法を試みたが, 処理水に若干のパーライトの混入が観察された。よって, 破碎前の球状パーライトの一部も流出し, 減少の一因になったものと考えられる。一方では, 運転の経過とともに, パーライトでネットが閉塞気味になり, 放流の所要時間が長引く傾向が生じた。よって, 長期間の運転継続は困難と考えられた。このため, パーライト粒の流出を効果的に阻止しつつ, しかも閉塞が生じないような処理水の引き抜き手法を確立することが必要である。この点が克服されれば, 実用化に向けて大きく近づくものと予想される。

謝 辞

試験の実施にご協力いただいた酪農経営者の皆様に深く

感謝いたします。また, 各種分析を担当した畜産草地研究所大久保慈泉氏, 男山啓子氏, 吉村恵子氏に謝意を表します。

文 献

- 日本下水道協会. 1997. 下水試験方法—1997 年版—. 日本下水道協会, 東京.
- 押田敏雄, 柿市徳英, 羽賀清典. 2012. 新編畜産環境保全論. p. 276, 養賢堂, 東京.
- Scholten E, Lukow T, Auling G, Kroppenstedt RM, Rainey FA, Diekmann H. 1999. *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1045-1051.
- Seviour R, Nielsen PH (eds). 2010. Microbial ecology of activated sludge. IWA Publishing, London, UK.
- 田中康男, 山下恭広, 荻野暁史. 2011. 球状パーライトを微生物担体として用いた省管理型処理装置による酪農雑排水処理. 日本畜産学会報 **82**, 405-411.
- 田中康男, 山下恭広, 横山 浩, 荻野暁史. 2010. 硬質パーライトを微生物担体として充填した好気性リアクターによる酪農雑排水の処理. 日本畜産学会報 **81**, 373-379.
- Yamashita T, Yokoyama H, Kanafusa S, Ogino A, Ishida M, Osada T, Tanaka Y. 2011. Nitrate-removal activity of a biofilm attached to a perlite carrier under continuous aeration conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **75**, 578-581.

Effects of perlite addition to dairy-farming-wastewater purification facilities as bacteria immobilizing material

Yasuo TANAKA¹, Hirokazu TACHINO², Yasuhisa NAGAMATSU², Masami YAMAMOTO³,
Takashi SHIBASAKI³ and Takahiro YAMASHITA¹

¹ National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba 305-0901, Japan

² Zenkoku Nogyokyoudoukumiai Rengokai, Chiyoda, Tokyo 100-6832, Japan

³ Chugoku-Kogyo Industry Co., Ltd., Kure 737-0192, Japan

Corresponding : Yasuo TANAKA (fax : +81 (0) 29-838-8606, e-mail : osuya@affrc.go.jp)

Effect of addition of particulate perlite (1.5–3 mm ϕ , 0.09 kg/L) into aeration tanks of activated sludge treatment facilities was examined in 2 full scale facilities (facility 1 and facility 2) treating dairy farming wastewater. Volume of aeration tank was 50 m³ (facility 1) and 30 m³ (facility 2). Perlite was added to the aeration tanks with 10% nominal volume in November, 2012. Water quality was analyzed 5–6 times before addition and 6–7 times thereafter. Concentration of the perlite in mixed liquor of the aeration tanks increased after a month, and then gradually decreased afterward. Water temperature of the farms were 18–24°C before addition and decreased from 18 to 12°C after addition. Regardless of the temperature decline, removal rates of total nitrogen and total inorganic nitrogen gradually increased from 80 to 95% after the addition in facility 1. These removal rates were almost stable between 68 to 77% after the addition in facility 2. The concentration of NO_x⁻-N increased markedly after addition in both farms. The copies number of DNA of genus *Thauera* in mixed liquor suspended solids correlated significantly with the amount of perlite in the mixed liquor. These results suggest that nitrogen removal activity was stimulated by the perlite.

Nihon Chikusan Gakkaiho 85 (1), 41–49, 2014

Key words : biofilm, livestock wastewater treatment, nitrogen removal, perlite, *Thauera*.