〈論文〉

細菌類の活性炭に対する親和性および生物活性炭
による基質の除去特性金 周 永* 稲 森 悠 平** 杉 浦 則 夫***
高 木 博 夫** 須 藤 隆 一*Affinity of Bacteria to Activated Carbon and Removal of Substrate
by Biological Activated CarbonJuyoung KIM*, Yuhei INAMORI**, Norio SUGIURA***,
Hiroo TAKAGI** and Ryuichi SUDO** Department of Civil Engineering, Faculty of Engineering, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980
Japan

** National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan

*** Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, Kasahara 993-2, Mito, Ibaraki 310 Japan

Abstract

In this study, characteristics of bacterial affinity to activated carbon (AC) and removal potentiality of TOC by biological activated carbon (BAC) were examined in batch culture experiment. With the desorption procedure of bacteria, ultrasonication for 3 min at 40W followed by vortexing for 10 sec was the favorable condition. The strength of bacterial affinity was estimated by enumeration of the desorbed bacteria from the AC with fluorescence microscope and the residual bacteria on the AC was certified with scanning electron microscope. The order of strength was as follows. *Pseudomonas ovalis* > *Escherichia coli* > *Acinetobacter calcoaceticus* > *Bacillus subtilis* > *Micrococcus luteus*.

In the study of TOC removal, removal efficiency by the five kind of BAC was quite different in the peptone-culture broth as a substrate for bacteria. The removal without BAC system with *M. luteus* was over 18%. The maximum removal of 43% was obtained from the BAC system with *B. subtilis*, while in case of the system with *M. luteus* the minimum removal of 2% was observed.

Key words : bacterial affinity, biological activated carbon, desorption TOC removal

1. はじめに

近年、生物活性炭処理法は、高濃度の有機性排水、難分解物質を含めた特定化学物質の共存する排水さらに上水道で問題となっている異臭味物質や有機塩素化

合物の前駆物質を含有する水質の処理に幅広く利用されるようになってきた^{1)~4)}。生物活性炭は通常の活性炭に比べ、対象とする汚濁物質の除去効率が高いこと⁵⁾、イオン性物質の除去が可能なこと⁶⁾、長期的安定性が得られること⁶⁾、経済効果がはかれること⁷⁾等の点

* 東北大学工学部土木工学科 〒980 仙台市青葉区荒巻字青葉

** 国立環境研究所 〒305 つくば市小野川16-2

*** 茨城県衛生研究所 〒310 水戸市笠原993-2

において優れている。これらの利点は介在する微生物群による作用が大きく関与しているためであるが Rice ら⁸⁾は1982年に現場の粒状活性炭上で従属栄養細菌群が有機物酸化に有効な役割を果たしていることを報告している。さらに、除去効果の見られた活性炭層から *Pseudomonas* 属をはじめ *Flavobacterium* 属, *Bacillus* 属, *Alcaligenes* 属等多種の細菌が見い出されている^{9),10)}。一方、従属栄養細菌群とともに原生動物、輪虫類、線虫類等が観察され、上水の処理水中への漏出障害も発生している^{11)~13)}。このように有効性あるいは障害のさまざまな現象が認められているにも係わらず、現在のところ活性炭における微生物の増殖特性、微生物間の相互作用等の生態的な役割、基質の吸着・分解機構と微生物群集との係わり合い等についての研究例は少ない。従って、対象とする汚濁物質を効果的に処理するためにはどのように有用な微生物を増殖・定着させるか、また、障害となる微生物をどのように抑制するかというような条件を具体的に見出すことが必要である。本研究では、上記の点を鑑み、生物活性炭を構成する微生物群のうち細菌類を対象として各種細菌類の活性炭に対する親和性および基質除去特性に検討を加えた。

2. 実験材料と方法

2.1 実験材料

1) 供試培地：本実験ではペプトン培地を用いた。すなわちペプトン (5 g), Yeast extract (2.5g), Glucose (1 g), NaCl (0.1g), K_2HPO_4 (1.6g), KH_2PO_4 (0.2g), H_2O 1 l, pH7.0の組成からなるものを用いた。

2) 供試細菌：使用した細菌は *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas ovalis*, *Bacillus subtilis* および *Escherichia coli* であり、醗酵研究所および東大応微研から分与されたものである。

3) 供試活性炭：用いた粒状活性炭は F-400 (カルゴン社製)であり粒径を28~48mesh に揃え、ミリポア水 (Millipore 社の Super-Q 超純水製造装置で処理した水をオートクレーブ滅菌した水) で十分洗浄し、105°Cで乾燥後、放冷したものを用いた。

2.2 実験方法

1) 基質の活性炭への吸着実験：基質の活性炭への吸着特性を調べるために300mlの三角フラスコにペプトン培地100mlを加え、さらに活性炭1 g, 3 g, 5 g, 10g をそれぞれ分取した。ついで振とう機で均一に攪拌・振とうしながら3時間間隔で試料を採取し、48時間吸着試験を行った。

Fig. 1 Acridine orange staining method of total bacteria counting

2) 付着細菌の脱離の方法：24時間おきに、50ml容のガラスシリンジを用いて無菌的に活性炭0.1gに相当する量を分取した。これを0.85% NaCl 溶液1 mlで2回洗浄した。次に同じ濃度の NaCl 溶液2 mlを添加し、強度および時間を変化させ、超音波処理を行った。超音波処理後、約10秒間ボルテックスブレンダーで強く攪拌したあと上澄液1 mlを取って溶液中の菌数および付着細菌数を調べた。

3) 生物活性炭の培養実験：基質添加系では、500 mlの三角フラスコに活性炭10g、培地180mlを分種し、2日間(平衡濃度に達する時間約24時間)回分振とう(100r.p.m)した後、細菌の培養液20mlを接種した。一方、基質無添加系では500mlの三角フラスコに活性炭10g、pH7.0の緩衝液180mlを加え、あらかじめ遠心洗浄した菌を20ml接種した。その後、両者の系について調製したサンプルを振とう(100r.p.m)しながら144時間まで20°Cで実験を行った。

2.3 測定方法

1) 細菌の測定：培養液および活性炭に付着した菌数は、全細菌の測定方法¹⁴⁾の一部を改変した方法で測定した (Fig. 1)。すなわち、Table 1 示す条件で実施した。まず、細菌の懸濁溶液を0.2μmのミリポアフィルターで濾過した後、濾紙の下面から0.01%のアクリジンオレンジ水溶液を15分間浸透させた。ついで2回

Table. 1 Exeprimental condition for total bacteria counting method

Filters	
· Brand name	; Nucle pore filter
· Pore size	; 0.2 mm
Pretreatment filters	
; None	
Efficient filtering area	; 226.98 mm
Sample volume	; 1ml
Aciridine orange	
· Brand name	; Merck
· Concentration(w/v)	; 0.02%
Staining Period	; 15~30 min
Rinsing after the staining	; by 0.5 ml water
Immersion oil(Brand name)	; Olympus
Optical system	
· Brand name and type	; Olympus AH-REL-LB
· Lamp	; 200-w mercury
· Exciter filter	; IF 490 x 2 EA
· Dichroic mirror	; DM 500
· Barrier filter	; 570 w
Object glass	
· Type	; UVFL
· Magnification	; 100
· N.A	; 1.30
· Total magnification	; 1,500

ミリポア水で下面から洗浄し、グルタルアルデヒド水溶液で固定し、蛍光顕微鏡で菌数を測定した。付着細菌の脱離状況については走査電子顕微鏡 (SEM) を用いた。

2) TOC の測定：培養期間中の基質の TOC 濃度変化は島津 TOC-500 アナライザーで分析し、評価した。

3. 結果および考察

3.1 基質の活性炭への吸着特性

基質の活性炭への吸着特性を調べる実験において約 9 時間で原液 $4,050 \text{ mg TOC} \cdot \text{l}^{-1}$ がそれぞれ $2,250$, $1,130$, 790 , $458 \text{ mg TOC} \cdot \text{l}^{-1}$ に達し、その後安定状態になった。この結果、活性炭 F-400 と培地との平衡時間は 9 時間となった。そこで得られた実験結果のもとに、活性炭への基質の吸着特性を次式で示される Freundlich 式で解析した。

Fig. 2 に示すように、 q と C の間には高い相関関係で Freundlich 式が成立し、 $1 \cdot n^{-1}$ は 1.12 、 k は 3.8×10^{-4} の値が得られた。活性炭吸着に関する既往研究¹⁵⁾ から、供試活性炭は、高い濃度域でペプトン培地の吸着特性にすぐれていると判断される。

3.2 活性炭炭層の細菌の脱離条件の選定

28~42 mesh の活性炭の担体に付着した細菌を効果的に脱離する方法について検討を行った。Fig. 3 は基質無添加系における各種細菌の活性炭からの脱離に及ぼす超音波強度の影響を調べた結果を示した。強度は 30~70 W で 3 分、5 分間超音波処理を行い、約 10 秒間強く攪拌したあと上澄液 1 ml を取って菌数を計算した。*M. luteus* の場合、3 分間 40 W の処理で菌数はやや

Fig. 2 Determination of constant for Freundlich adsorption isotherm

増加したが 70 W まではほぼ一定であった。一方、5 分間 40 W 処理の条件では逆に菌数の減少がみられた。しかし、40~70 W の範囲ではほとんど変化が認められなかった。30 W 以外は、3 分間処理のほうが 5 分間処理に比べ脱離菌数が多かった。その他 *A. calcoaceticus*, *P. ovalis*, *B. subtilis* および *E. coli* の 4 種についても、ほぼ同様に 3 分間の処理条件では、5 分間処理に比べておおむね脱離菌数の増加が見られた。処理時間が長いにもかかわらず菌数が減少したのは、細胞が破壊されたためと考えられる。その他 4 種の菌についても同様の傾向を示し、細胞の損傷状態を考慮して強度 40 W、3 分間が適しているものと判断し、以下の実験ではこの条件で実施した。Fig. 4 は *M. luteus* の超音波処理の前後を比較した SEM の写真であるが、強度 40 W、3 分間で処理した後は処理前に比べ、明らかに脱離している。また、その他の菌についても超音波処理したものの SEM 観察より、おおむね 90% 以上が脱離していることがわかった。この実験の結果、付着細菌を脱離させる上で強度、時間を適正な条件に設定して超音波処理を行えば活性炭もほとんど破壊されず、細胞を損傷することなく活性炭に付着した菌数を計数することができることがわかった。本実験では、活性炭からの細菌の脱離方法として 3 分間の超音波処理で行ったが Burlingame ら¹⁶⁾ は、30 分間が有効とし、また、Stewart ら¹⁷⁾ は、ボルテックス振動後、5 分間の超音波処理を利用している。一方、ホモジナイザー法によると 80~90% の細菌が脱離し、計数の誤差が小さくなるとして採用している報告もある¹⁷⁾。従って、脱離法として何を利用するかは、目的とする処理水の性質、共存する細菌類および活性炭の種類を少なくとも把握し決定すべきであろう。

Fig. 3 Effects of ultrasonication on a desorption of bacteria from activated carbon
 Symbols: ●— 3min, ○— 5min

3.3 基質添加の有無における各種細菌と活性炭の親和性

Fig. 5 に基質添加の有無における各種細菌の培養経過に伴う付着量を示した。いずれの細菌も培養から24時間までは基質の有無に関係なく顕著な増加を示し、48時間で最大量となった。なお、この実験では基質添

加系は培養24時間後、培養液中の菌数はいずれも $10^6 \sim 10^7$ (cells·ml⁻¹) 存在し、基質無添加系では $10^5 \sim 10^6$ (cells·ml⁻¹) 存在した。基質添加系では *P. ovalis* が最も多く、ついで *E. coli*, *A. calcoaceticus*, *B. subtilis* の順となり *M. luteus* が最も少なかった。また、無添加系の場合もほぼ同じ傾向を示した。しかし付着量に関

Fig. 4 SEM photograph of *M. luteus* on activated carbon
a) before ultrasonication b) after ultrasonication

Fig. 5 Time course of number of bacteria attached to activated carbon

Symbols: —○— *P. ovalis*, —●— *E. coli*,
—△— *M. luteus*, —■— *B. subtilis*,
—□— *A. calcoaceticus*

a) Number of bacteria in the system with substrates
b) Number of bacteria in the system without substrates

しては無添加系の方が1~2ケタ少なかった。これは栄養物質としての基質が存在しないため活性炭表面における細菌の増殖がほとんど認められなかったものと判断される。細菌の活性炭に対する親和性に関して *P. ovalis*, *E. coli* は基質の有無に係わらず他の細菌類に比べ付着量が多かったがこれは活性炭に対する親和性が強いことが考えられる。また, *A. calcoaceticus* および *B. subtilis* の親和性は, とくに栄養物質の共存により促進された。これは, 栄養物質の存在により, 細菌の活性が高まり, 付着性の強い代謝物質を放出したことも考えられる。*Pseudomonas* は実際に, パイロットプラントから数多く単離されている¹⁰⁾。一方, 最終処理水としての浄水に含まれる活性炭からは *E. coli* が高頻度で検出されている¹⁰⁾。細菌の活性炭に対する親和性は介在するさまざまな要因すなわち物理・化学あるいは生物学的影響によって, また, 微生物間の相互作用等によって異なるものと考えられるため特定基質のみならず, 利用目的によって想定される要因を十分把握し, その影響を検討する必要がある。

3.4 生物活性炭による TOC の除去効果

生物活性炭による TOC 除去効果を評価する上では

Fig. 6 Removal efficiency of TOC by biological activated carbon with *B. subtilis*

Symbols: —□— Number of *B. subtilis* in the system without BAC
—■— Number of *B. subtilis* in the system with BAC
—○— TOC concentration in the system without BAC
—●— TOC concentration in the system with BAC
—▲— Number of attached *B. subtilis* on AC

Table. 2 Removal efficiency of TOC by biological activated carbon

Species of bacteria	without BAC		with BAC		AR(%)
	mg · l ⁻¹	removal efficiency (%) ^{a)}	mg · l ⁻¹	removal efficiency (%) ^{b)}	
Blank	710	—	710	—	—
<i>B. subtilis</i>	550	23	240	66	43
<i>A. calcoaceticus</i>	600	15	400	44	29
<i>P. ovalis</i>	310	56	170	76	20
<i>E. coli</i>	390	45	260	63	18
<i>M. luteus</i>	265	63	245	65	2

AR:Actual removal efficiency of BAC(%) ; b)-a)

Cultivation period : 144 h

活性炭が吸着平衡に達していることが必要であることから500ml 三角フラスコに培地200ml と活性炭10g を添加して吸着平衡させるために約24時間振とう下で吸着させた。吸着平衡後の液中の TOC は710mg · l⁻¹ であり24時間後も変化は認められなかった。そこでこのような前処理した活性炭に細菌を接種して培養経過に伴う TOC と細菌の変化を調べた。Fig. 6 に *B. subtilis* を用いて活性炭の添加系と無添加系における TOC の除去の影響に関する実験結果を示した。なお、実験開始時における活性炭は基質で完全に平衡に達せしめたものを用いた。TOC は活性炭の添加、無添加に係わらず24時間までは著しい減少が見られたがその後144時間までほぼ一定の値を推移した。しかし TOC は添加系の方が約43% も高い除去率を示した。一方、活性炭に付着した細菌数を調べたところ24時間までに顕著な増殖を示した。ところが活性炭が共存する系の遊離の細菌数と活性炭の存在しない系における細菌数はこの培養期間ではほとんど変化が見られなかった。従って、活性炭に吸着した細菌が TOC の除去に大きく貢献しているものと判断できる。とくに平衡に達せしめた活性炭に付着した細菌が遊離した細菌に比べ $1 \cdot 100^{-1}$ 倍程度の存在量にもかかわらず TOC の除去率が向上したことは、生物活性炭が明らかに有効であることを示している。さらに、*B. subtilis* 以外の細菌4種 (*M. luteus*, *A. calcoaceticus*, *E. coli*, *P. ovalis*) について同様の実験を行った (Table 2)。*A. calcoaceticus* に注目すると TOC の除去率は活性炭の共存する系と共存しない系を比較すると共存する系がほぼ3倍も高いことがわかった。また、*P. ovalis* および *E. coli* についても生物活性炭による TOC の除去効果が認められた。しかし *M. luteus* の場合は2%程度の効果しかなかった。以上のことから生物活性炭による TOC の除去は細菌の種類によってその効果に大きな差が認められることがわかった。*B. subtilis* の場合、付

着能は低かったが TOC の除去率から見ると最大の付着能を持つ *P. ovalis* に比べ著しく高かった。付着能と基質分解能とは細菌によって明らかに異なった。しかし、現場では様々な細菌、原生動物、後生動物が介在しているため室内の実験系とはかなり異なるはずである。従って、さらに現場に近い混合細菌系で実験系を実施する必要がある。

4. ま と め

1) 活性炭に付着した細菌数を適正に評価するための脱離条件は、超音波処理条件を40W, 3分間とし、その後10秒間強く攪拌して測定すれば活性炭の破壊もなく、細胞の損傷も受けず脱離できることがわかった。

2) 活性炭への細菌の付着速度は初期24時間が最も高くなり培養48時間でほぼ一定になった。

3) 活性炭への細菌の付着量は、5種類の細菌の内 *P. ovalis* がもっとも多く、ついで *E. coli*, *B. subtilis*, *A. calcoaceticus* が中程度で *M. luteus* が少なかった。

4) 細菌の活性炭への付着量は、基質添加系、無添加系はいずれも細菌の種類によって変動性がみられた。

5) 生物活性炭による TOC の除去率は、5種類の細菌のうち *B. subtilis* 系が最大で43%、最も少ない *M. luteus* 系では2%となった。

(原稿受付 1992年6月30日)

(原稿受理 1992年10月28日)

引 用 文 献

- 1) Rice, R.G., Miller, G.W., Robson, C.M. and Kuhn, W. (1978) Carbon adsorption hand book, p.485, Cheremisnoff, P.N., Ellerbusch, F., Ann Arbor Science Press.
- 2) Gardner, D.A., Suidan, M.T. and Kobayashi, H.A. (1988) Role of GAC activity and particle size during the fluidized anaerobic treatment of refinery stripper bottom, *Jour. WPCF*, 60, 503-513.

- 3) 小林敏昭, 難波敬典, 松原宗治, 浦野紘平 (1988) オゾン及び活性炭による浄水処理, 水道協会雑誌, **57**, 15-29.
- 4) 大住旦生, 藤田正樹, 井上嘉高, 山本正視, 川崎一司 (1989) 生物, オゾン粒状活性炭の組み合わせによる高度浄水処理プラント実験, 水道協会雑誌, **58**, 2-13.
- 5) 藤原啓助, 梶野勝司, 芦田谷和芳, 寺嶋勝彦 (1987) パイロットプラントを用いた淀川原水中の微量有機物の高度処理実験 (I), **56**, 14-24.
- 6) 小林敏昭, 難波敬典, 松原宗治, 浦野紘平 (1988) オゾン及び活性炭による浄水処理, **57**, 15-29.
- 7) Bablon, G.P. Ventresque, C. and Aim, R.B. (1988) Developing a sand-GAC filter to achieve high-rate biological filtration, *Jour. AWWA.*, **80**, 47-53.
- 8) Rice, R.G. and Robson, C.M. (1982) Biological activated carbon (Enhanced aerobic biological activity in GAC system), pp. 321-354, Ann Arbor Science Publishers., Michigan.
- 9) McElhaney, J. and HcKeon, W.R. (1985) Enumeration and identification of bacteria in granular activated carbon columns, pp. 1-22, Proceedings of the Water Quality Technology Conference, Huston, Texas, Am. Wat. Works. Assoc., Denver.
- 10) Burlingame, G.A., Suffet, I.H. and Pipes, W.O. (1986) Predominant bacterial genera in granular activated carbon water treatment system, *Can. J. Microbiol.*, **32**, 226-230.
- 11) Fiessinger, F., Rook, J.J. and Duguet, J.P. (1985) Alternative methods for chlorination, *The Science of the Total Environment.*, **47**, 299-315.
- 12) Rollinger, V. and Doot, W. (1987) Survival of selected bacterial species in sterilized activated carbon filters and biological activated carbon filters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 777-781.
- 13) 三輪雅幸, 森實圭二 (1988) オゾン・粒状活性炭処理における後生動物の挙動, 用水と排水, **30**, 880-886.
- 14) 日本水道協会 (1985) 上水試験方法.
- 15) 井出哲夫 (1990) 水処理工学—理論と応用—, 114pp., 技報堂, 東京.
- 16) Stewart, M.H., Wolfe, R.L. and Means, E.G. (1990) Assessment of the bacteriological activity associated with granular activated carbon treatment of drinking water, *App. Environ. Microbiol.*, **56**, 3822-3829.
- 17) Camper, A.K., Lechevallier, M.W., Broadaway, S.C. and McFeters, G.A. (1986) Bacteria associated with granular activated carbon particles in drinking water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 434-438.