微生物の活性炭への付着が微生物活性に及ぼす影響

森 長 久 豊* 西 嶋 渉* 岡 田 光 正*

Effect of Bacterial Adhesion on Activated Carbon on Bacterial Activity

Hisatoyo MORINAGA*, Wataru NISHIJIMA* and Mitsumasa OKADA*

* Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, Hiroshima University, 1-4-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-0046 Japan

Abstract

This study was carried out to clarify the effects of bacterial adhesion on powdered activated carbon (PAC) on bacterial activity using nitrate reduction activity of *E. coli* K-12. *E. coli* K-12 was incubated with or without PAC. Additional amount of PAC ranged from 300 to 5,000 mg $\cdot$ l⁻¹ at 7.75×10^7 cells $\cdot$ ml⁻¹ or from 20 to 90 mg $\cdot$ l⁻¹ at 1.78×10^8 cells $\cdot$ ml⁻¹ of *E. coli* K-12. The cells concentration was also changed from 2.23×10^7 to 1.58×10^8 cells $\cdot$ ml⁻¹ at a constant concentration of PAC, 1,000 mg $\cdot$ l⁻¹. High specific nitrate reduction rate was observed in cultures with PAC than those without PAC. The specific nitrate reduction rate increased with the increase in the ratio of adhered cells to total cells. The relationship between the specific nitrate reduction rate and the ratio of adhered cells to total cells was expressed by first order proportional equation. The results indicate that the adhesion of bacteria on activated carbon stimulates bacterial activity. The stimulation of bacterial activity did not result in adsorption of substrate, products or oxygen on PAC, therefore, it must depend on the interaction between adhered bacteria and the surface property of PAC.

Key words: adhesion of bacteria, Powdered Activated Carbon (PAC), stimulation of bacterial activity

1. はじめに

活性炭添加活性汚泥法 (PACT 法) は、通常の活性汚泥法では処理困難な生物活性阻害物質、毒性物質を含む排水に適用されることが多い。PACT 法では活性汚泥法の曝気槽に粉末活性炭 (PAC) を通常数百～数千 mg $\cdot$ l⁻¹ 添加する。活性汚泥法では処理困難な有機物を活性炭吸着によって除去し、易分解性有機物は活性汚泥によって分解除去する。生物活性阻害物質や毒性物質を含む排水の場合、活性炭の吸着作用によって生物活性阻害物質や毒性物質を除去し、それらの物質による活性汚泥の機能低下を防ぐ。その結果として生物処理が安定化すると考えられている¹⁻⁷⁾。

一方、PAC 添加は生物活性阻害物質や毒性物質の吸着除去とは異なる機構によって活性汚泥の難分解性有機物を始めとする有機物分解能を向上させたとする報告がある。Specchia ら⁸⁾は活性汚泥に吸着能のない耐火レンガ粉末を添加した場合には全く分解されなかった染料が、PAC を添加することで生分解されたと報告している。Chao ら⁹⁾は活性汚泥中に PAC を添加して難分解性のシアン化合物、チオシアン化合物を含む COD600～1,400

mg $\cdot$ l⁻¹ の製鋼工場排水を処理した場合、シアン、チオシアン化合物の生分解がそれぞれ約1.1倍、約1.5～9倍に向上したことを示した。また、Orshansky ら¹⁰⁾はフェノール合成排水を対象に、活性汚泥への PAC 添加量を増すことによりフェノール生分解速度の上昇が見られ無添加系に比べて約2倍～3.5倍向上したと報告している。谷口らは、PAC 添加が活性汚泥微生物に与える影響として活性汚泥微生物群の生物活性の変化、生物相の変化に着目して実験を行った結果、PAC を添加することによってフェノール、m-アミノ安息香酸の生分解速度がそれぞれ約4～10倍、約4～7倍に増加したが、反応槽内の資化菌数、生物相に大きな相違がないことを示した¹¹⁾。以上のように、PAC を添加することで菌数や菌相に変化がないものの、みかけ上活性汚泥微生物の活性が促進されると考えられている。

このように活性炭共存下で微生物の有機物分解能が高い理由として、西嶋らは、有機物が液相に比べて活性炭上に極めて高濃度に存在し、その吸着有機物が微生物活性に影響を及ぼしていると推定した¹²⁾。一方、活性炭表面上に高濃度に吸着された酸素¹³⁻¹⁵⁾や付着細菌と有機物との接触時間の増加¹⁶⁾が活性炭付着細菌の活性を高める

* 広島大学工学部環境基礎化学講座 〒739-0046 東広島鏡山1-4-1

可能性があるとも考えられている。

上記の仮説はいずれも微生物が活性炭上に付着していることを前提にしているが、これまでの PACT 法に関する研究は、活性炭と微生物の共存形態、すなわち微生物が活性炭表面に付着しているか、液相中に活性炭とは別々に浮遊しているのかが十分考慮されていない。そこで本研究では、活性炭共存下における微生物活性の向上と微生物の存在形態、すなわち付着して存在しているか、それとも単に浮遊して共存しているかが活性にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。実験は、菌体に *E. coli* を用い、菌体活性に対する吸着酸素の影響、吸着基質の影響、吸着生成物の影響を回避するために、基質、生成物の吸着を考慮する必要のない無酸素下の硝酸還元活性を指標とした。

2. 実験方法

2.1 実験試料

菌株は *E. coli* K-12株 (HUT8106) を用いた。*E. coli* は無酸素条件下で硝酸イオンを亜硝酸イオンに硝酸還元する¹⁷⁻¹⁹⁾ことが知られている。培養液の基質組成は Table 1²⁰⁾ (基本培地組成を参考にした) に示した。活性炭は粉末活性炭 (PAC, Calgon 社製 Filtrasorb400) を使用し、粒径は53~75 μ m (200~282メッシュ) に揃えて超純水で十分洗浄し、110°C で乾燥後、放冷したものを用いた。PAC の比較担体として非吸着担体 (カオリン, 和光純薬工業株式会社製) を用いた。カオリンは PAC と同粒径とした。同様に超純水で洗浄し、110°C で乾燥後、放冷したものを用いた。器具、材料は予め全てオートクレー

ブ滅菌した。

2.2 PAC 添加実験

比硝酸還元速度に対する PAC 添加の影響を検討するために、PAC 添加、無添加における *E. coli* の硝酸還元速度を比較した。NO₃⁻イオン、NO₂⁻イオンとも PAC にほとんど吸着しないため、比硝酸還元速度は NO₂⁻の生成初速度 (mg-N $\cdot$ cell⁻¹ $\cdot$ h⁻¹) によって評価した。培養は100 ml のバイアル瓶を使用し、培養液量は80ml とした。培養温度は30°C とし、120rpm で10時間振とうした。硝酸還元に必要な有機物としてギ酸を用いたため、PAC は前もってギ酸で液相濃度が10g $\cdot$ l⁻¹になるように吸着平衡にし、それを0~5,000mg $\cdot$ l⁻¹になるように添加した。PAC については、実験開始前にギ酸水溶液ごとオートクレーブ処理した。菌体は Table 1 の培地から KNO₃ を除き、新たに2.0g $\cdot$ l⁻¹の (NH₄)₂SO₄ を加えた培地で好氣的に前培養 (約24時間) したものを Table 1 の培地に1.0 $\times$ 10⁷~2.0 $\times$ 10⁸cells $\cdot$ ml⁻¹になるように再懸濁した。

菌体、PAC は十分に分散させるために、実験開始直前にそれぞれ3分、15分間培養液中で80W の超音波処理を行い、混合した。液相を無酸素状態にするため無菌 N₂ ガスで15分間曝気した。

添加したギ酸の量は PAC 添加、無添加両系において実験期間中消費による大きな濃度変化が起きないように過剰量添加 (222mM, 10g $\cdot$ l⁻¹) した。また、実験期間中は液相濃度をほぼ10g $\cdot$ l⁻¹に保つため、2時間毎に液相濃度を測定し、減少分をその都度ギ酸ナトリウム溶液 (300g $\cdot$ l⁻¹, pH7.0) を追加した。

実験系列は、菌体濃度、PAC 濃度を変えることによって様々な付着菌数/全菌数の比率を作成できるように組み合わせた。菌体濃度一定 (菌体初濃度=7.75 $\times$ 10⁷cells $\cdot$ ml⁻¹) で、PAC 濃度を300, 700, 1,000, 3,000, 5,000 mg $\cdot$ l⁻¹ と変えた系列、菌体濃度一定 (菌体初濃度=1.78 $\times$ 10⁸cells $\cdot$ ml⁻¹) で、PAC 濃度を20, 50, 70, 90mg $\cdot$ l⁻¹ と変えた系列と、PAC 濃度一定 (1,000mg $\cdot$ l⁻¹) で、菌体初濃度を2.23 $\times$ 10⁷, 8.43 $\times$ 10⁷, 1.15 $\times$ 10⁸, 1.58 $\times$ 10⁸cells $\cdot$ ml⁻¹ と変えた系列を設定した。また、比較として菌体濃度一定 (7.75 $\times$ 10⁷cells $\cdot$ ml⁻¹) の条件で PAC と同容積になるようにカオリンを添加した実験を行った。添加濃度はカオリンに対してそれぞれ100, 290, 680, 970, 2,920, 4,860mg $\cdot$ l⁻¹である。コントロールとして PAC, カオリン無添加の実験を菌体濃度2.23 $\times$ 10⁷, 6.39 $\times$ 10⁷, 7.75 $\times$ 10⁷, 8.87 $\times$ 10⁷, 1.15 $\times$ 10⁸, 1.58 $\times$ 10⁸, 1.78 $\times$ 10⁸ cells $\cdot$ ml⁻¹で行った。

2.3 分析方法

NO₂⁻濃度はイオンクロマトグラフィー (ダイオネックス製 DX500), ギ酸濃度は HPLC (東ソー製 UV8000, 東ソー製 TSK-GEL SCX) を用いて分析した。菌数は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を用いた直接計数法 (落射式蛍光顕微鏡 Nikon Optiphot-2, Hg100W ランプ, Nikon filter cassette UV, UV 励起; ダイクロックミラー400nm, 励起フィルタ330~380nm, 吸収フィルタ420nm) で測定した²¹⁾。PAC に対する付着菌数は全体の菌数から浮遊菌数を差し引くことで求めた。浮遊菌数は、PAC あるいはカオリンを含む *E. coli* 培養液を25 μ m ナイロンメッシュフィルター (NBC 工業) に通したる液中の菌数とした。

Table 1 Composition of the synthetic medium

Components	1L
formate	10.0g
KNO ₃	0.8g
K ₂ HPO ₄	35.0g
KH ₂ PO ₄	15.0g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 2H ₂ O	2.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5g
Vitamin solution [#]	5ml
Mineral solution ^{##}	5ml
Yeast Extract	0.5g

This solution was adjusted at pH 7.0 and autoclaved for 20 min at 121°C.

#. Vitamin solution contains 400mg Calcium Pantothenate, 200mg Inositol, 400mg Nicotinic Acid, 200mg p-Aminobenzoic Acid, 400mg Vitamin B₆, 400mg Vitamin B₁, 2mg D-Biotin, 0.5mg Vitamin B₁₂ in one liter.

##. Mineral solution contains 1.0g NaCl, 2.0g CaCl₂ 2H₂O, 0.5g FeSO₄ 7H₂O, 0.5g ZnSO₄ 7H₂O, 0.5g MnCl₂ 4H₂O, 0.05g CuSO₄ 5H₂O, 0.1g Na₂MoO₄ 2H₂O, 0.05g Na₂WO₄ 2H₂O, 10ml conc. HCl in one liter.

3. 実験結果および考察

3.1 比硝酸還元速度に対する菌体初濃度の影響

Fig. 1 に PAC 無添加時における比硝酸還元速度に及ぼす菌体初濃度の影響を示す。菌体初濃度 $1.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 範囲内におけるプロット点を最小二乗法によって検討し、得られた回帰直線を統計的に検定した結果、比硝酸還元速度が菌体初濃度に対して依存性がないことを確認した。よって、菌数が $2.0 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ までは比硝酸還元速度は菌体初濃度に関わらずほぼ一定と考えても差し支えなく $2.7 \times 10^{-11} \sim 3.3 \times 10^{-11} \text{ mg-N} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。しかし、それ以上の菌数では明らかに比硝酸還元速度は低下した。硝酸還元反応に伴って生成される NO_2^- は *E. coli* の硝酸還元反応に阻害的に働くことが報告されている^{17,22)}。菌体初濃度が高い系では、 NO_2^- が速やかに系内に高濃度 ($30 \text{ mg-N} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上) で蓄積されたことを確認しており、そのために比硝酸還元速度が低下したと考えられる。本実験条件下では菌体初濃度が $2.0 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以下であれば生成 NO_2^- の影響を受けないことから、以降の実験では菌体初濃度を $1.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の範囲に調整した。

3.2 比硝酸還元速度に対する PAC 添加の影響

Fig. 2 に比硝酸還元速度に対する PAC 添加 (20, 50, 70, 90, 300, 700, 1,000, 3,000, 5,000 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) の影響を示す。PAC 添加によって比硝酸還元速度が向上した。しかし、PAC 濃度と比硝酸還元速度とに明確な相関はなかった。PAC 無添加の比硝酸還元速度の平均に対して PAC 添加系の比硝酸還元速度は最大で約 1.4 倍まで向上した。

一方、カオリンを微生物付着担体として添加した場合には、カオリン添加量 (100, 290, 680, 970, 2,920, 4,860 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) に関係なく、比硝酸還元速度は $3.1 \times 10^{-11} \sim 3.3 \times 10^{-11} \text{ mg-N} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ の範囲であった。この値は PAC 無添加系の値 $2.7 \times 10^{-11} \sim 3.3 \times 10^{-11} \text{ mg-N} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ とほぼ一致し、カオリンの添加効果はみられなかった。従って、PAC 添加系における最大約 40% の比硝酸還元速度の促進は、PAC の特有の現象であることが確認できた。

Fig. 1 The effect of total cells on specific nitrate reduction rate

なお、実験期間中、全ての系において液相中の硝酸濃度は $9.1 \sim 10.8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ の範囲で調整した。また、この硝酸濃度から計算した液相に存在する硝酸量 (728~864 mg) に対して、 30°C における硝酸の吸着等温線式 ($\ln Q = -5.75 + 0.67 \ln C$; Q, C はそれぞれ吸着量 [$\text{g} \cdot \text{g-PAC}^{-1}$], 平衡濃度 [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]) から計算した活性炭に吸着した硝酸量 (1.1~5.9 mg) は極めて小さかった。したがって、比硝酸還元速度に対する PAC に吸着した硝酸の影響は無視できると考えられる。また、硝酸を電子供与体とした *E. coli* の硝酸還元過程で生じる代謝産物は主に CO_2 と H_2O であり^{19,22)}、代謝産物の影響も無視できると考えられる。このことから、比硝酸還元速度が向上した理由は、活性炭上の有機物が液相に比べて高濃度に存在し、その吸着有機物が微生物活性に影響を及ぼしているからではなかった¹²⁾。

3.3 比硝酸還元速度に対する菌体付着の影響

次に比硝酸還元速度に対する PAC 上への菌体の付着の影響を検討した。Fig. 3 に全菌数に対する付着菌数の割合と比硝酸還元速度の関係を示す。両者の関係は $Y = (8.99 \times 10^{-14})X + 3.33 \times 10^{-11}$ で表すことができ一次の比例関係であった。ただし、 Y, X はそれぞれ比硝酸還元速度 [$\text{mg-N} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$], 全菌数に対する付着菌数の割

Fig. 2 Effect of PAC addition on specific nitrate reduction rate

Fig. 3 Effect of the ratio of adhered cells to total cells on specific nitrate reduction rate

合 [%] である。統計的に検定した結果、この回帰直線が有効であることを確認した(決定係数 $R^2=0.34$)。このことから菌体が PAC 上に付着することで硝酸還元速度が一次的に比例して促進したことがわかった。

本実験条件は、活性炭に吸着しない硝酸を基質に用いたこと、無酸素条件であること、電子供与体である硝酸は活性炭に吸着しているもののその存在量は液相の方がはるかに大きく濃度変化がなかったことから、従来考えられてきた活性炭の微生物活性に影響を及ぼす因子は硝酸還元活性に影響を及ぼしたとは考えられない。すなわち、活性炭上の吸着物質の濃度が液相に対して高いため、その吸着物質が付着微生物に影響を与えたことや、吸着酸素が付着微生物の代謝活性に影響を与えたとは考えられない。また接触時間等吸着作用に付随する因子として、高濃度に吸着した物質と付着微生物との接触時間の増加が微生物活性に影響を与えたともいえない。よって、微生物の付着面である活性炭の表面特性が、特に活性炭表面と直接付着している菌体の活性を促進している可能性があることが示唆された。

ただし、これまでの報告されている諸説は推定に過ぎないため、生物活性炭における細菌の活性向上機構とそれら諸説における因子の影響とを完全に分けて定量化したものは報告されていないが、本研究は生物活性炭における上記の従来の諸説を否定するものではない。PAC が存在することでシアン、チオシアン化合物の生分解がそれぞれ約1.1倍、約1.5～9倍に向上した Chao ら⁹⁾の報告、フェノール生分解速度が約2倍～3.5倍向上した Orshansky ら¹⁰⁾の報告、また、フェノール、m-アミノ安息香酸の生分解速度がそれぞれ約4～10倍、約4～7倍に増加した谷口ら¹¹⁾の報告等と比較して、本研究で得られた細菌の活性炭付着による活性促進の影響(最大約1.4倍にまで促進した)はそれほど小さくなく、生物活性炭における細菌の活性向上における支配的因子とはいいいがたい。

4. ま と め

本研究では活性炭共存下における微生物活性の向上と微生物の存在形態、すなわち付着して存在しているか否かとの関係を検討した。その結果 PAC を添加することで *E. coli* が PAC 上に付着し、硝酸還元活性が一次的に全菌数に対する付着菌数の割合に比例して促進することがわかった。また、*E. coli* の硝酸還元活性の促進は、従来提案されてきた吸着物質、吸着酸素、基質との接触時間の延長等活性炭の吸着作用には起因しないと考えられた。

謝 辞

本研究の実験にあたり、広島大学中央廃液処理施設助教授(現 広島工業大学教授)の正藤英司先生のご協力をいただいた。ここに記して感謝の意を表します。

(原稿受付 2000年9月1日)

(原稿受理 2001年2月15日)

参 考 文 献

- 1) Specchia, V. and Gianetto, A. (1984) Powdered Activated

Carbon in an Activated Sludge Treatment Plant, *Water Research*, **18**, 133-137

- 2) Scaramelli, A.B. and Digiano, F.A. (1973) Upgrading the Activated Sludge System by Powdered Carbon, *WATER & SEWAGE WORKS*, **10**, 90-94

- 3) Ramakrishna, C., Kar, D. and Desai, J.D. (1989) Biotreatment of Acrylonitrile Plant Effluent by Powdered Activated Carbon - Activated Sludge, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **67**(6), 430-432

- 4) Jonge, R.J., Breure, A.M. and Andel, J.G. (1991) Enhanced biodegradation of *o*-cresol by activated sludge in the presence of powdered activated carbon, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**, 683-687

- 5) Weber, W.J., Jones, J.E. and Katz, L.E. (1987) Fate of Toxic Organic Compounds in Activated Sludge and Integrated PAC Systems, *Wat. Sci. Tech.* **19**, 471-482

- 6) Sundstrom, D.W., Klei, H.E., Tien, T. and Nayar, S. (1979) Response of biological reactors to the addition of PAC, *Water Research*, **13**, 1225-1231

- 7) Thibault, G.T., Tracy, K.D. and Wilkinson, J.B. (1977) PACT performance evaluated, *Hydrocarbon Processing*, **May**, 143-146

- 8) Specchia, V. et al. (1987) Mechanisms of Activated Carbon Bioremoval, *Chem. Eng. Comm.* **68**, 99-117

- 9) Chao, Y.M., Yeh, T.F. and Shieh, W.K. (1986) PAC-activated sludge treatment of a steel mill coke-plant wastewater, *Journal of Water Pollution Control Fed.*, **59**, 199-211

- 10) Orshansky, F. and Narkis, N. (1997) Characteristics of organics removal by PACT simultaneous adsorption and biodegradation, *Water Research*, **31**(3), 391-398

- 11) 谷口日出雄, 西嶋渉, 村上昭彦, 岡田光正, 細見正明(1993) PAC 添加活性汚泥法における活性炭の効果, *水環境学会誌*, **16**(8), 577-584

- 12) Nishijima, W. Akama, T., Shoto, E. and Okada M. (1992) Effects of Adsorbed Substances on Bioactivity of Attached Bacteria on Granular Activated Carbon, *Water Science and Technology*, **35**, 8, 203-208

- 13) Kalinske, A.A. (1972) Enhancement of biological oxidation of organic wastes using activated carbon in microbial suspension, *Water and Sewage Works*, **119**, 62-64

- 14) Prober, R., Pyeha, J.J. and Kidon, W.E. (1975) Interaction of Activated Carbon with Dissolved Oxygen, *AIChE Journal*, **21**, 1200-1204

- 15) Ying, W.C. and Weber E.J. Jr. (1979) Bio-physicochemical Adsorption Model Systems for Wastewater Treatment, *Journal WPCF*, **51**, 2661-2677

- 16) Committee Report (1981) An Assessment of Microbial Activity on GAC, *Journal AWWA*, **73**, 447-454

- 17) Mcnall, E.G. and Atkinson, D.E. (1956) Nitrate Reduction I. Growth of *Escherichia coli* with Nitrate as Sole of Nitrogen, *Journal of Bacteriology*, **72**, 226-229

- 18) Wimpenny, J.W.T. and Cole, J.A. (1967) The Regulation of Metabolism in Facultative Bacteria III. The effect of Nitrate, *Biochimica et Biophysica Acta*, **148**, 233-242

- 19) Ruiz-Herrera, J. and Demoss, J.A. (1969) Nitrate Reductase Complex of *Escherichia coli* K-12: Participation of Specific Formate Dehydrogenase and Cytochrome *b*₁ Components in Nitrate Reduction, *Journal of Bacteriology*, **Sept.** 1969, 720-729

- 20) 日本生物工学会編 (1992) 生物工学実験書, 培風館

- 21) 日本海洋学会編 (1985) 沿岸環境調査マニュアル (II) 水質・微生物篇, 恒星社厚生閣

- 22) Stewart, V. (1988) Nitrate Respiration in Relation to Facultative Metabolism in Enterobacteria, *Microbiological Reviews*, **June**, p190-232