活性汚泥および汚泥構成細菌の凝集における金属イオンの役割*

柿 井 一 男

1. はじめに

下水の二次処理や工場排水の処理に広く用いられている活性汚泥法では、最終沈殿池における汚泥と処理水の固液分離特性が最も重要な操作因子である。そこで、その開発以来、活性汚泥の凝集現象について高い関心が寄せられているが、未だにその機構を明確に説明するには至っていない。この主な理由として、1) 汚泥の性状や汚泥構成細菌がおかれた環境条件下で大きく変化すること、2) どのような起源の汚泥についても、通常これを構成する細菌相は多種多様であることを挙げることができる。従って、ある1つの活性汚泥に限定しても、その凝集は1つの機構でのみ説明でき得るものではなく、これに参加するものの総計として捕らえるべきものと解釈される。

そこで本稿では、下水活性汚泥およびこれより分離されたある種の細菌群に焦点を絞り、その凝集に金属イオンがいかに関係しているかについて紹介することを目的とした。

2. 下水活性汚泥の凝集

下水活性汚泥のフロック表面はタンパク質およびリボ核酸 (RNA) を主とし、デオキシリボ核酸 (DNA) および酸性ヘテロ多糖を従とする細胞外高分子で覆われており^{1),2)}、これらの分子間相互作用により凝集が引き起こされているものと思われる。しかし、これらの細胞外高分子がいずれも分子内にカルボキシル基またはリン酸基を有することから、金属イオンが実際にそ

の電氣的反発を解消し、汚泥の性状に深く関わっているものと予想した。そこで、下水活性汚泥中の金属含量と汚泥を取り巻くイオン雰囲気についての詳細な分析を行った³⁾。

2.1 下水活性汚泥中の金属含量

ある下水処理場からサンプリングした活性汚泥の性状と金属含量の季節的变化を調べた結果を表1に示した。汚泥容量指標 (SVI) は96.6~295 ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$) にわたり、夏期に減少し、冬期に増加する傾向を示した。これとは逆に、灰分は夏期に増加し、冬期に減少する傾向を示した。これは、夏期には冬期よりも水温が10°Cほど高く、夏期に汚泥の自己酸化がより進行するためと思われた。また、総金属含量は灰分含量の約23%に相当していた。このことは、下水汚泥中の金属イオンが汚泥の性状と密接に関係していることを示唆したものであった。各金属の詳しい定量分析から、下水汚泥が年間を通じて比較的多量のカルシウム ($14 \sim 16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 乾燥汚泥⁻¹)、アルミニウム ($11 \sim 28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 乾燥汚泥⁻¹) および鉄 ($11 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 乾燥汚泥⁻¹) を含むことが示された。マグネシウム、マンガンおよび亜鉛については上述の3種類の金属より一桁低い含量であった。アルミニウムと鉄は季節的にその含量が変化したのに対し、カルシウムの含量は年間を通じてほぼ一定であった。

2.2 下水活性汚泥混合液中の溶存態イオン濃度

宇都宮市内の2カ所の異なる下水処理場よりサンプリングした汚泥混合液中の各種溶存態イオン濃度の測定結果を表2に示した。川田および田川両下水処理場においては、 NH_4^+ と NO_3^- を除いて、陽イオンおよび陰イオンの濃度には大きな差は見られず、その中で、陽イオンとしては Na^+ が $32 \sim 34 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 Ca^{2+} が $20 \sim 24 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と多く含まれており、 Ca^{2+} が2価金属イオンの主成分であった。一方、陰イオンとしては Cl^- が $28 \sim 33 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 SO_4^{2-} が $29 \sim 37 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と多く含まれていた。両処理場の NH_4^+ と NO_3^- 濃度を比較することから、田川処理場においてはサンプリングした時期に硝化が進行していたことがわかる。ここで、下水中には約0.5mM 相当の Ca^{2+} が含まれていることに注目しておきたい。

Kazuo Kakii

昭和50年 東北大学大学院理学研究科
修士課程修了

同年 宇都宮大学工学部助手
工学博士

〔趣味〕 スポーツ

* Role of Metallic Ions in the Flocculation of Activated Sludge and Sludge-Constituting Bacteria, 1990年2月7日受理

表1 下水活性汚泥の性状と金属含量の季節的变化

年 月	1983								1984	
	2	5	6	7	9	10	11	12	1	2
SV ₃₀ (%)	13.0	18.0	11.4	12.0	12.2	30.0	24.9	47.5	50.0	26.0
MLSS (g・l ⁻¹)	0.858	1.58	1.18	1.13	1.24	2.11	1.69	1.61	2.35	1.51
SVI (ml・g ⁻¹)	151	114	96.6	106	98.4	142	147	295	213	172
灰分 (%)	23.8	33.0	31.5	29.0	27.4	22.4	22.8	20.2	21.0	22.7
水温 (°C)	13.2	17.8	18.7	21.5	20.3	18.2	18.0	15.0	13.4	12.6
Mg(mg・g-乾燥汚泥 ⁻¹)	4.2	5.3	5.0	3.4	3.8	3.1	3.0	4.4	5.5	4.8
Al	12.2	27.7	21.3	17.9	16.1	15.6	12.9	11.5	11.0	12.2
Ca	14.2	15.2	16.0	14.2	14.5	13.6	14.9	14.1	15.1	15.2
Cr	0.04	0.12	0.14	0.04	0.01	0.19	0.19	0.15	0.11	0.12
Mn	0.60	1.2	1.3	1.2	1.3	1.2	1.0	0.40	0.40	0.60
Fe	15.3	29.6	29.1	26.4	20.0	19.7	15.1	12.0	10.9	11.4
Co	0.012	0.014	0.013	0.014	0.011	0.010	0.010	0.004	0.005	0.006
Ni	0.096	0.048	0.057	0.079	0.049	0.045	0.037	0.065	0.111	0.090
Cu	0.36	0.28	0.29	0.37	0.34	0.41	0.35	0.32	0.37	0.32
Zn	1.80	0.81	0.91	1.80	1.80	0.90	0.85	0.95	0.97	1.01
Pb	0.039	0.071	0.099	0.060	0.050	0.077	0.083	0.066	0.069	0.072
Cd	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002	0.002
総金属 (mg・g-乾燥汚泥 ⁻¹)	48.850	80.346	74.212	65.467	57.963	54.835	48.423	43.957	44.537	45.820

表2 下水活性汚泥混合液中の溶存態イオン濃度

イオン (mg・l ⁻¹)	下水処理場	
	川田	田川
陽イオン		
NH ₄ ⁺	15.4	2.7
Na ⁺	34.1	31.6
K ⁺	7.3	6.5
Mg ²⁺	4.6	4.4
Ca ²⁺	23.9	19.9
陰イオン		
Cl ⁻	33.2	28.1
NO ₃ ⁻	3.2	35.5
SO ₄ ²⁻	37.0	29.2
PO ₄ ^{3-*}	5.5	4.7

2.3 下水活性汚泥の凝集における Ca²⁺の役割

下水汚泥中にカルシウム、アルミニウムおよび鉄が比較的高濃度に含まれていることを2.1において示した。こうした金属が汚泥の性状に実際にどのような役割を演じているかを明らかにするには、汚泥からこれらの金属を選択的に抽出除去したり、再構成的に添加する方法が考えられる。前述のように、下水活性汚泥は酸不溶性の高分子で覆われている。そこで、pH 3 という穏やかな酸性条件を金属の抽出条件とした。表3

表3 弱酸処理前後における下水活性汚泥中の金属含量変化

金属	処理前 (mg・g-乾燥汚泥 ⁻¹)	処理後
Mg	3.1	1.5
Al	15.6	15.7
Ca	13.6	2.2
Mn	1.2	0.5
Fe	19.7	20.3
Zn	0.9	0.4

はこの弱酸処理前後における主な金属の含量変化を示したものである。この結果より、カルシウムのみが選択的かつほぼ定量的に下水汚泥から抽出されることが明らかとされた。この弱酸処理により Ca²⁺を選択的に抽出除去した汚泥を用い、下水汚泥の性状に及ぼす Ca²⁺の役割を pH 7 において調べた結果が図1である。実験に用いた下水汚泥中のカルシウム含量は弱酸処理により18.4から3.9mg・g-乾燥汚泥⁻¹に減少した。30分間静置後の活性汚泥沈殿率 (SV₃₀) とその上澄みの660nm における濁度 (OD₆₆₀) は Ca²⁺の添加濃度と共に減少し、1 mM 以上の添加でほぼ一定の数値となった。この汚泥の性状が安定化した1 mM の添加条件における Ca²⁺の吸着量は11.7mg・g-乾燥汚泥⁻¹であり、弱酸処理で抽出された Ca²⁺量の81%に相当していた。この Ca²⁺の再現的な吸着は汚泥表面の有機的な構造が弱酸処理で変化を受けていないことを裏づけた。

図1 弱酸処理下水活性汚泥の性状に及ぼす Ca^{2+} の添加効果

$\text{MLSS}=2.01\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

○: SV_{30} , △: 30分間静置後の上澄みの OD_{660} ,

●: Ca^{2+} 吸着量.

ものであった。

以上のことから、 Ca^{2+} は下水汚泥の凝集性ばかりでなく圧密性にも重要な役割を果たしていることが示された。

3. 下水活性汚泥からの凝集性細菌の分離

下水汚泥から抽出される細胞外高分子の1つの主成分がタンパク質であること、下水汚泥の凝集に Ca^{2+} が重要な役割を演じていることを踏まえ、市販のタンパク質分解酵素であるアクチナーゼEおよびキレート試薬であるエチレンジアミン四酢酸ナトリウム(EDTA)を汚泥の選択的解体剤として用い、凝集性細菌の分離を試みた。表4にはこうして分離された凝集性細菌の菌株名とその同定結果をまとめているが、これらは腸内細菌科またはビブリオ科に属していた。ただし、菌体の培養には表5に示したポリペプトン培地を用いた。また、菌体の凝集性を定量的に表現するため、全菌体中でフロック状の菌体の占める割合をフロック化率(F, %)と定義し、以下の式よりフロック化率を算出した。

$$F(\%) = (\text{OD}_{660} - \text{OD}'_{660}) / \text{OD}_{660} \times 100$$

OD_{660} : 全菌体の完全分散状態における660 nmにおける濁度

OD'_{660} : $400 \times \text{g}$ で2分間遠心分離した上澄みの660nmにおける濁度

表4に示した菌株では、KE10株を除く7株がその凝集に Ca^{2+} を要求する Ca^{2+} 依存性フロック形成菌であった。これらの菌株は起源の異なる2つのサンプルから分離されたものであることから、このような種類の細菌は広く下水汚泥中に分布しているものと予想さ

表4 下水活性汚泥から分離された凝集性細菌

菌株	同定結果
KA103*	腸内細菌科 <i>Kluyvera cryocrescens</i>
KE5	腸内細菌科 <i>Kluyvera cryocrescens</i>
KA467*	腸内細菌科 <i>Enterobacter</i> 属
KE16	腸内細菌科 <i>Enterobacter</i> 属
TE4	腸内細菌科 <i>Enterobacter</i> 属
TE13	腸内細菌科 <i>Citrobacter freundii</i>
KE2	ビブリオ科 <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>
KE10	腸内細菌科 <i>Kluyvera cryocrescens</i>

*印および無印はそれぞれアクチナーゼEまたはEDTA処理で分離されたことを示す。

表5 Ca^{2+} 添加ポリペプトン培地組成

ポリペプトン	10 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 g
NaNO_3	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
NaCl	0.1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01g
K_2HPO_4	1.0 g
蒸留水	1.0 l

Ca^{2+} 除去培地の調製には、 Na^+ 型の陽イオン交換樹脂(Dowex 50W)充填カラムを通したポリペプトンを用い、 CaCl_2 の添加を省略した。pHは7.0とした。

れる。

4. 細菌の凝集機構

ここでは、表4に示した8つの菌株のうち、 Ca^{2+} 依存性および非依存性のフロック形成菌を代表して、KA103株とKE10株の凝集機構を紹介する。図2に示したように、これらの菌株は表5の Ca^{2+} 添加ポリペプトン培地において大きくサイズの異なるフロックを形成した。

4.1 KA103株について

まず、KA103株のポリペプトン培地での凝集における多価金属イオンの選択性を検討した。 Ca^{2+} 除去ポリペプトン培地に多価金属イオンを0.25mM添加し、フロックの形成に及ぼす影響を調べた結果が表6である。 Ca^{2+} の添加の場合にのみ96%という高いフロック化率が得られ、 Ca^{2+} に選択的な凝集を示した。

また、 Ca^{2+} 除去ポリペプトン培地で増殖した分散状菌体も十分濃度の Ca^{2+} の添加で凝集した。そこで、この分散状菌体を10mM トリス緩衝液(pH7.5)で洗浄し、0.5mMの多価金属イオンを含む同緩衝液中でフロックの形成を調べた結果が表7である。用いた2価金属イオンの中では、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} および Fe^{2+} で凝集が

図2 Ca^{2+} 添加ポリペプトン培地で形成されたフロックの写真
1 : KA103株, 2 : KE10株
スケールは1 mm,

表6 ポリペプトン培地におけるKA103株の凝集に及ぼす多価金属イオンの添加効果

金属イオン	フロック化率 (%)
なし	6.0
Mg^{2+}	8.5
Ca^{2+}	95.7
Sr^{2+}	5.8
Ba^{2+}	5.8
Mn^{2+}	5.4
Fe^{2+}	7.7
Co^{2+}	9.2
Ni^{2+}	9.2
Cu^{2+}	6.0
Zn^{2+}	6.6
Al^{3+}	3.1
Fe^{3+}	6.1

ただし、培養後の測定結果である。

見られ、ここでも Ca^{2+} が88%という特に高いフロック化率を示した。3価金属イオンの Al^{3+} と Fe^{3+} でも97%という高いフロック化率が得られたが、このように凝集力に優れた Al^{3+} や Fe^{3+} は下水中に溶存していないことから、下水中での KA103株の凝集には主に Ca^{2+} が関与しているものと予想した。

そこで、種々の濃度の CaCl_2 溶液に分散状菌体を懸濁し、凝集に及ぼす Ca^{2+} 濃度の影響を調べた。実際に下水中に溶存している0.5mMの Ca^{2+} 濃度ではフロック化率は48%であり、1.5mM以上の Ca^{2+} 濃度で初めて93%以上という高いフロック化率が得られた。このため、 Ca^{2+} の濃度を一定の0.5mMとし、共存塩の代表

表7 トリス緩衝液中におけるKA103株の凝集に及ぼす多価金属イオンの添加効果

金属イオン	フロック化率 (%)
なし	13.8
Mg^{2+}	18.0
Ca^{2+}	87.7
Sr^{2+}	37.2
Ba^{2+}	11.4
Mn^{2+}	6.0
Fe^{2+}	48.5
Co^{2+}	7.4
Ni^{2+}	6.5
Cu^{2+}	実験せず
Zn^{2+}	実験せず
Al^{3+}	96.7
Fe^{3+}	96.7

として NaCl を用いて凝集に及ぼす影響を調べた。3.2 mM以上の NaClの添加で91%以上という高いフロック化率が得られ、 Na^+ に Ca^{2+} による KA103株の凝集を助長する効果のあることを見出した。また、電気伝導度の測定から、下水は Ca^{2+} 以外に NaClに換算して2.6~3.2mM相当のイオンを含むことが示された。従って、KA103株は下水中では Ca^{2+} およびその他の共存イオンの共同効果で安定なフロックを形成しているものと判断した。

一方、KA103株のフロックはアクチナーゼE処理により完全に解体された⁴⁾。また、分散状菌体をアクチナーゼEばかりでなく、その他のタンパク質分解酵素であるトリプシンおよびキモトリプシンで処理しても Ca^{2+} による凝集が全く見られなくなった。これらの結果は、菌体の表面に存在するタンパク質も凝集に参加していることを示したものであった。このことに関しては現在詳しく検討中である。

4.2 KE10株について

ポリペプトン培地で形成された KE10株のフロックは蒸留水中に懸濁することにより解体する。そこで、 Ca^{2+} 添加ポリペプトン培地で培養し、蒸留水で洗浄した分散菌体を用いて、フロックの形成に及ぼす各種金属塩化物の影響を調べた。図3は実験を行った9種類の金属イオンを代表して、 Na^+ 、 Ca^{2+} および Fe^{3+} の凝集効果を比較したものである。ここでは、金属イオンの添加濃度に対して、400×gで2分間遠心分離した後の上澄みの菌体懸濁液の660nmにおける透過率(T,%)をプロットしている。これより、3種類の金属

図3 KE10株の凝集に及ぼす金属イオン濃度の影響
1: Na⁺, 2: Ca²⁺, 3: Fe³⁺.

イオンの凝集力は $\text{Fe}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Na}^{+}$ の順であることがわかる。因みに、これらの金属イオンにおいて、高いフロック化率 (95%以上) を得るために必要な金属イオン濃度は、 Fe^{3+} が 0.029 mM, Ca^{2+} が 0.055~0.057 mM, Na^{+} が 23~28 mM であった。 Ca^{2+} についてのこの数値は下水中に溶存する Ca^{2+} 濃度の約 1/9 に相当していた。ここで、凝集を開始するために必要な最低の金属イオンの濃度を臨界凝集濃度 (CFC, mM) と定義し、図3の Na^{+} について行ったように2つの直線の交点から9種類の金属イオンのCFCを求め、結果を表8にまとめた、これより、金属イオンの価数が高ければ高いほど、KE10株は低濃度の金属イオンの添加で凝集することが示された。また、表8の結果は2価の金属イオンの中では Ca^{2+} が特に高い凝集力を有することを示したものであった。

ところで、疎水コロイドの凝集に対する電解質の対イオンによる原子価効果は経験的にシュルツェーハーディーの法則として知られ、DLVO理論によって証明されている。即ち、CFCはコロイド粒子の対イオンの価数の6乗に逆比例し、価数1, 2, 3に対して

$$1:2^{-6}:3^{-6}=100:1.6:0.13$$

の比例関係にあるというものである。表8の数値から、

表8 KE10株の凝集における各種金属イオンの臨界凝集濃度

金属イオン	CFC (mM)
Li^{+}	8.7
Na^{+}	12
K^{+}	5.6
Mg^{2+}	0.72
Ca^{2+}	0.048
Sr^{2+}	0.22
Ba^{2+}	0.51
Al^{3+}	0.023
Fe^{3+}	0.023

KE10株の凝集はシュルツェーハーディーの法則にはほぼ従っていることが理解される。

以上、下水中にはKE10株の菌体が凝集するのに必要な約10倍濃度の Ca^{2+} が溶存状態で含まれているため、活性汚泥混合液中では主に Ca^{2+} によって凝集しているものと結論した。また、KE10株の菌体の凝集はシュルツェーハーディーの法則に従っていたため、本菌体は一種の疎水コロイドと見なすことができた。

5. おわりに

本稿においては、主に Ca^{2+} を中心とする金属イオンが下水活性汚泥とこれを構成する一部の細菌の凝集に重要な役割を演じていることを紹介した。しかしながら、他方でこれらの凝集に下水汚泥や細菌細胞の表面に存在する有機物質が関係していることも忘れてはならない。今後、双方からの検討を加えて詳細な凝集機構を明らかにしていきたい。

文 献

- 1) Kakii K., Shirakashi T., and Kuriyama M. (1984) Some properties of mucilage polysaccharides extracted from sewage activated sludge, *J. Ferment. Technol.*, **62**, 429-435.
- 2) Kakii K., Kitamura S., Shirakashi T., and Kuriyama M. (1986) Comparison of mucilage polysaccharides extracted from sewage activated sludge, *J. Ferment. Technol.*, **64**, 51-56.
- 3) Kakii K., Kitamura S., Shirakashi T., and Kuriyama M. (1985) Effect of calcium ion on sludge characteristics, *J. Ferment. Technol.*, **63**, 263-270.
- 4) Kakii K., Sugahara E., Shirakashi T., and Kuriyama M. (1986) Isolation and characterization of a Ca^{2+} -dependent floc-forming bacterium, *J. Ferment. Technol.*, **64**, 57-62.