水産廃水活性汚泥の微生物に関する研究 (第1報) 活性汚泥の酵素による分散と生菌数の測定

平石 明 ・ 銭谷 武平

(長崎大学 水産学部)

Studies on Microorganisms in Activated Sludge
of Fishery Waste Water-I.

Dispersion of activated sludge by enzymes and
the enumeration of viable bacteria.

Akira HIRAISHI and Buhei ZENITANI

Faculty of Fisheries, Nagasaki University

は し が き

水産加工廃水の活性汚泥は沈降性が悪く(土屋ら, 1966), バルキングをおこしやすく(中島, 1966), また一般活性汚泥処理の場合とは逆に pH 低下の傾向がある(大宰, 1968)などの特異性が指摘されている。

一般に水産加工廃水の活性汚泥は管理がかなり困難といわれているが, これらの活性汚泥において浄化の主役をなす細菌類やバルキング原因菌などについては, ほとんど研究がなされていない。

著者らは高BODのすり身製造工場廃水の活性汚泥処理に関与する微生物を研究するため, まず汚泥フロックの分散法および生菌数の計数培地について検討し, 若干の知見を得たのでこれらの結果について報告する。

実験材料および方法

1. 活性汚泥

長崎市京泊町長崎県水産加工センターのかまぼこすり身製造工場の廃水処理施設の曝気槽から採取した汚泥, 返送汚泥および圧縮脱水処理した余剰汚泥を供試した。また10 l 瓶に廃水 5 l を入れ, これに予め実験室内で馴養した活性汚泥を当初MLSS 1000ないし1200ppmになるように添加し通気培養した汚泥も供試した。

2. 汚泥の各 pH における沈降性

沈降汚泥 20g (乾物 2.8g) また汚泥混液 50ml (乾物 0.26g) を用い, 1 N塩酸あるいは1 N水酸化ナトリウム溶液で pH を調整し全量 100mlとした後, 5℃で15分間マグネティックスタラーで攪拌した。30分間静置し, 汚泥容量および上澄液中の糖とタンパク質の測定を行った。

3. 汚泥内粘質物の抽出と成分同定

粘質物の抽出法は専ら Ueda & Earle (1972) の方法によった。粘質物の水解試料は, 乾燥粉末 1 mgに 2 N塩酸 1 mlを加え, 封管内で 100℃, 8時間加熱し開封後残存塩酸を駆逐して調製した。糖類はペーパークロマトグラフィー (Block *et al.*, 1958) により検出・同定し, また確認に当たり一部の糖については呈色反応液の吸収スペクトルも参考にした。

4. 分析方法

全糖はフェノール硫酸法, アミノ糖は Elson & Morgan 法 (Blix, 1948) により, グルコースおよびグルコサミン塩酸塩をそれぞれ標準として測定した。タンパク質は Lowry ら (1951) の方法, また核酸は Schmidt & Thannhauser (1945) の方法により全核酸を抽出して紫外部吸収量 (OD_{260}) を測定し, ジフェニルアミン法 (Burton, 1956) によるDNA量を差引きRNA量を算出した。

5. 粘質物の分解および汚泥分散試験

酵素による分解試験は Friedman ら (1968) および Kato ら (1971) の方法をもとに実施した。酵素剤はセルラーゼ “オノヅカ” (近畿ヤクルト), マセロチーム (前同), リボスクレアーゼ (Sigma Chemicals), トリプシン (P-L Biochemicals), プロナーゼ E (科研科学) およびリゾチーム (E. Merck) の6種を供試した。キレーターは Table 2 の5種をそれぞれ0.25%溶液として使用した。酵素作用後, 上澄液中の遊離糖はフェノール硫酸法により測定し試験液 Gt から対照液 Gc の測定値を差引きグルコースとして表わし, また遊離アミノ

酸はニンヒドリン法 (Moore & Stein, 1954) により L-ロイシンを標準として同様に Lt-Lc 量で示した。

フロック分散率 (D%) は次式によった。

$$D\% = \frac{(At/Bt - Ac/Bc)}{(1 - Ac/Bc)} \times 100$$

At : 酵素処理後, フロック懸濁液を 0 ~ 4 °C で 1 時間静置した後の上澄部の OD, Ac : 対照 (酵素未処理) の上澄部の OD, Bt : 処理後のフロック懸濁液の OD, Bc : 対照の懸濁液の OD。OD は日立分光光度計 101 型を用い 660nm で測定した。

6. 汚泥フロック中の生菌数の測定

生菌数測定用の汚泥試料の処理は地田ら (1971) の要領に従いホモジナイズした。また酵素剤やキレーターによる汚泥の分散処理については Fig. 5 に示した。

細菌の生菌数計数培地は, 普通肉汁培地・桜井培地 (桜井, 1967)・混合ペプトン酵母エキス培地 (P P Y E)・廃水培地・汚泥抽出液培地 (Prakasam & Don-dero, 1967) などの寒天培地を用いた。また 1/2 濃度の P P Y E 培地を基本培地とし, Table 4 に示した他の栄養源補足培地についても試験した。

処理した汚泥試料は逐次 10 倍希釈し平板流込法により 25 °C で 7 日間培養してコロニー数を計数した。なお酵母の菌数測定には, クロラムフェニコール 100 ppm 添加した麦芽エキス酵母エキス培地を用いた。

実 験 結 果

1. 汚泥抽出粘質物の性状について

すり身製造廃水活性汚泥の各 pH における沈降性ならびに糖・タンパク質の遊離状況を Fig. 1 に示す。アルカリ側 (pH 13) において沈降性が最も特異的で, 膨潤して全く沈降しない場合 (試料 A) と, 沈降は良好であるがフロックが分散して上澄液が濁る場合 (試料 B) とが認められた。また酸性側 (pH 1) においても沈降性の変化とともに糖・タンパク質の遊離があり, 西川・栗山 (1968) が下水汚泥で得た結果とは相違が見られた。

抽出粘質物はアルカリ溶液に溶解するが, その収率には変動があり 6 月採取汚泥 (S V I 115) から乾物当たり 1 N アンモニア水抽出物 3.3% と 2% E D T A 抽出物 4.7% で, また 12 月採取汚泥 (S V I 240) からは前者の 2 ~ 3 倍量であった。実験室内汚泥で検討したところ, 一般に S V I が高い程粘質物の収量は大きかった。

粘質物の水解試料からはグルコース・リボース・ラムノース・グルコサミンおよびグルクロン酸を検出した。粘質物の主な有機物組成は Table 1 のようでタンパク質が最も多く, 多糖および核酸も含有していた。

Fig. 1. Effect of pH on the abilities to settle and release of protein and polysaccharide of activated sludge. Sample A (upper) : residual sludge, 20 g (dry wt. 2.8g) ; sample B (lower) : mixed liquor of activated sludge, 50 ml (dry wt. 0.26 g). Open circle, OD₆₆₀ of supernatant; closed circle, sludge volume; open tri angle, protein and closed tri angle, polysaccharide.

Table 1. Components of mucilage extracted from activated sludge.

Component, %	Extract of	
	1 N NH ₄ OH	2% EDTA
Protein	30.5	48.2
Total sugar	10.3	8.8
Amino sugar*	6.9	5.4
DNA	1.0	5.4
RNA*	2.9	6.4

Data show the mean values of five trials (*two trials). SVI of activated sludge, 115.

Fig. 2. Release of amino acids from mucilage of activated sludge by Pronase E.
Reaction system : mucilage, 3.0 mg; Pronase E, 0.1 mg ; 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 5 ml. Temp., 37°C.

Fig. 3. Release of sugar from mucilage of activated sludge by cellulase or lysozyme.
Open circle, cellulase and black circle, lysozyme. Reaction system : mucilage, 3.8 mg ; cellulase 0.5 mg ; 0.1 M acetate buffer (pH 4.5), 5 ml or lysozyme, 0.2 mg; 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) with 0.2 mM EDTA, 5 ml. Temp., 37°C.

2. 粘質物の分解と汚泥フロクの分散

汚泥フロクの分散試験に先立ち抽出粘質物の酵素剤による分解を試みた。Fig. 2 のようにプロナーゼEが効

果的で粘質物中のタンパク部分は速やかに消化された。一方、セルラーゼやリゾチームは粘質物の分解が比較的に弱く長時間的作用によっても効果は少なく (Fig. 3), またマセロチームやトリプシンによる粘質物処理も同様に分解が弱かった。

次に汚泥フロクに対し、まず5種のキレーターによる分散試験を行ない Table 2 の結果を得た。また酵素剤による分散状況は Table 3 に示すように粘質物分解の場合とはほぼ同様の傾向を見せプロナーゼEが効果的であった。キレーターと併用した場合ではプロナーゼE・EDTAが分散に最も効果があり、そのフロク分散過程はFig. 4 に示すように、プロナーゼEによるタンパク質分解生成物の増加とともにEDTAによる糖の遊離が認められた。

3. 汚泥フロク中の生菌数

細菌数の計数培地として普通肉汁培地・桜井培地・P P Y E 培地・廃水培地・汚泥抽出液培地の各寒天培地を用いて比較培養した結果では、コロニー数はP P Y E, 桜井, 汚泥抽出液培地の順に多く他の供試培地では最高値の半分以下であった。よってさらに $\frac{1}{2}$ P P Y E 培地を基礎にし、グルコース, 廃水あるいは汚泥抽出液を補足した培地と比較した結果 Table 4 のように汚泥抽出液を加えた培地が最高の菌数を与えた。 $\frac{1}{2}$ P P Y E + 汚泥抽出液培地を用い, Fig. 5 に示した分散処理を施した室内実験試料について比較した結果, Table 5 のように単に5分間ホモジナイズした試料に比べて約2~8倍の生菌数の増加が認められた。なお酵素剤とキレーターの供試濃度は予め細菌の発育阻害試験を行なった上で決定した。別に測定した酵母数は $10^{3-4}/\text{ml}$ 程度で、カビ類も存在した。

Table 2. Deflocculation of activated sludge by chealators.

Chealators	Deflocculation, %
Ethylendiaminetetra-acetic acid (EDTA)	42
Nitrilotriacetic acid	34
Sodium pyrophosphate	33
Sodium tartarate	12
Sodium citrate	12

A sample of sludge ; SVI=193. Initial OD₆₆₀ of floc suspension ; 1.1 to 1.8. Chealators were used as 0.25% solution. Reaction 3 hrs. at 35°C.

Table 3. Enzymatic deflocculation of activated sludge.

Enzyme	Concn. %	Buffer solution	Reaction temp. °C	Plant	Deflocculation, % Laboratory
Cellulase	0.1	0.1 M acetate pH 4.5	37	4~7	6* 3~6 5*
Macerozyme	"	"	"	6~11	9 0~2 1
Ribonuclease	0.05	0.02 M phosphate pH 7.5	"	8~16	12 — —
Trypsin	"	0.01 M Tris-HCl pH 8.0	35	7~9	8 4~8 6
Pronase E	"	"	"	30~45	37 20~31 24
Pronase E +2 mM EDTA	"	"	"	45~63	56 38~51 46
Lysozyme +2 mM EDTA	"	"	"	26~53	44 24~40 36

Samples of activated sludge: Plant, SVI 115 to 240. Laboratory, SVI 72 to 112.

Initial OD₆₆₀ of floc suspension, 1.0 to 1.5. Reaction time : all 3 hrs. *Mean of four trials.

Fig. 4. Effect of Pronase E and EDTA on activated sludge-flocs. Open mark, Pronase E and EDTA; closed mark, Pronase E. Circle, release of amino acids; tri angle, release of sugar.

Table 4. Comparisons of media for the enumeration of viable bacteria in activated sludge.

Test media	Viable bacteria $\times 10^7/\text{ml}$	Colored colonies, %		
		Non	C.G	Y.O.B.
A. $\frac{1}{2}$ PPYE *	110	35	8	57
B. A +0.1 % glucose	120	51	12	37
C. A + fishery waste water **	82	72	11	17
D. A + activated sludge extract **	150	29	15	56

* PPYE : proteose peptone, 0.2 % ; polypeptone, 0.2% and yeast extract, 0.1%.

** The same volume was added to PPYE.

Sample : MLSS 1580 and SVI 78.

7- day culture at 25°C.

Symbols : C.G. cream and gray; Y.O.B. yellow, orange and brown respectively.

Table 5. Comparisons of the viable bacteria in activated sludge by Pronase E treatment.

Treatment	Viable bacteria, $\times 10^7/\text{ml}$		
	20 hrs	48 hrs	80 hrs*
Control	98	16	18
Pronase E	310	130	62
Pronase E with EDTA	420	110	30
Pronase E with $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	330	100	48
Sample of sludge :	MLSS	1620	1410
SVI	93	100	111

Data show the results of 7- day culture with medium D of Table 4 at 25°C.

*Culturing time in laboratory.

* Final concentration of EDTA and $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ was 0.001 M and 0.01 M respectively.

** Same treatment as sample B.

Final volume of all sample is the same by an addition of 0.02 M Tris-HCl buffer solution.

Fig. 5. Preparation of sample for bacterial enumeration of activated sludge by treatment with enzyme and chealator.

考 察

活性汚泥中の細菌数の測定には、汚泥フロックを十分に分散させることが必要である。供試汚泥のフロック形成と分散に関連して、まず粘質物組成をしらべた処、主としてタンパク質と多糖・核酸を含み、これらを Povani ら (1972) はフロック形成関連ポリマーと考えている。室内モデル実験によると汚泥フロック内に蓄積するタンパク質は同化期間中に次第に増加するが以後漸減し、一方多糖類は内生呼吸期に入ってもほとんど減少せず生物学的分解には抵抗性を示した。従って供試汚泥のフロックは微生物の自己消化などにより溶出した核タンパク質がかなり重合し、また金属イオンも不溶化に関与し (Nishikawa & Kuriyama, 1968; 西川・栗山, 1974) 形成・保持されているものと思われる。

汚泥フロックは機械的に分散させても再凝集しやすく、完全な分散は困難ではあるが、プロナーゼ E・EDTA

の併用処理は分散に効果が認められた。それ故セルラーゼが分散に有効という *Zoogloea* を主体とした汚泥フロック (Deinema & Zevenhuizen, 1971) とは異なるようで、Kato ら (1971) は *Flavobacterium dormitator* のデフロックにプロナーゼ E の効果を認めている。

酵素・キレーターによる分散処理後生菌数を測定すると、2 倍から時には 10 倍近い菌数増加を示し処理効果にかなりの差異が認められた。これは汚泥内の生菌と死菌との割合の差異によるものと考えられ、死菌の多いフロックでは分散が効果的であったとしても、それ程多くの菌数増加が認められないのではなかろうか。また計数培地としては $\frac{1}{2}$ P P Y E + 汚泥抽出液培地が総菌数も多く、色素生産菌の出現率も高く計数培地として適していると考えられる。

得られたすり身汚泥中の細菌数は最高 $3 \sim 4 \times 10^9/\text{ml}$ 程度で、一般的には $10^{8-9}/\text{ml}$ と見るべきであろう。測定

方法や計数培地の相違によりにわかに比較できないが、例えば下水汚泥の場合 $10^9/\text{ml}$ (手塚, 1968) あるいは $10^{7-8}/\text{ml}$ (地田ら, 1971), また超音波処理で $10^9/\text{ml}$ 前後 (Banks & Walker, 1977) の生菌数が得られている。

ま と め

魚肉ねり製品の原料すり身製造工場の活性汚泥について実験し、次の結果を得た。

1. 汚泥中粘質物はタンパク質を主体とし、アミノ糖を含む多糖および核酸からなる複合体であった。
2. 汚泥フロクの分散には EDTA とプロナーゼ E の併用が比較的有効でフロク分散率 46~56% が得られた。
3. 汚泥中の生菌数の計数には汚泥抽出液添加培地が最高の生菌数を与え、汚泥中には $10^{8-9}/\text{ml}$ の細菌と $10^{3-4}/\text{ml}$ の酵母が存在した。

謝 辞

この研究を実施するに当たり、試料の提供などの便宜を賜った長崎水産加工業協同組合工場長松本政次氏、同谷川昭夫部長ならびに多比良純一氏に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Banks, C.J., and Walker, I. : Sonication of activated sludge flocs and the recovery of their bacteria on solid media. *J. gen. Microbiol.*, **98**, 363-368 (1977)
- 2) Blix, G. : The determination of hexamines according to Elson and Morgan. *Acta Chem. Scan.*, **2**, 467-473 (1948)
- 3) Block, R.J., Durrum, E.L., and Zewig, G. : A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. 2nd Ed., Acad. Press. London (1958)
- 4) Burton, K. : The conditions and mechanism of the diphenyl amine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62**, 315-322 (1956)
- 5) 地田修一・渡辺昌希・石田耕一・吉野孝子・萩原純子・安田勉 : 活性汚泥中の生菌数の計数法について. 日本水処理生物学会誌, **6** (2), 11-14 (1971)
- 6) 大宰宙朗 : 活性スラッジ法による魚肉練製品の廃水処理について. 水処理技術, **9** (2), 37-40 (1968)
- 7) Deinema, M.H., and Zevenhuizen, L. P. T. M. : Formation of cellulose fibrils by Gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. *Arch. Mikrobiol.*, **78**, 42-57 (1971)
- 8) Friedman, B. A., Dugan, B.R., Pfister, R.M., and Remsen, C. C. : Structure of extracellular polymers and their relationship to bacterial flocculation. *J. Bacteriol.*, **89**, 1328-1334 (1968)
- 9) Kato, A., Izaki, K., and Takahashi, H. : Flocc-forming bacteria isolated from activated sludge. *J. gen. appl. Microbiol.*, **17**, 439-456 (1971)
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Fan, A. L., and Peandall, R.J. : Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 11) Moore, S., and Stein, W.H. : A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, **211**, 907-913 (1954)
- 12) 中島文夫 : 魚肉ねり製品食品工場の廃液処理に関する研究. 用水と廃水, **8**, 869-874 (1966)
- 13) 西川正三・栗山光央 : 活性汚泥中の粘質物に関する研究. 醸工, **46**, 381-386 (1968)
- 14) Nishikawa, S., and Kuriyama, M. : Nucleic acid as a component of mucilage in activated sludge. *Water Res.*, **2**, 811-812 (1968)
- 15) 西川正三・栗山光央 : 活性汚泥中の粘質成分としての核酸. 醸工, **52**, 335-338 (1974)
- 16) Povani, J. L., Tenney, M. W., and Echelberger, W. F. Jr. : Bacterial exocellular polymers and biological flocculation. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **44**, 414-431 (1972)
- 17) Prakasam, T.B.S., and Dondero, N. C. : Aerobic heterotrophic bacterial populations of sewage and activated sludge. I. Enumeration. *Appl. Microbiol.*, **15**, 461-467 (1967)
- 18) 桜井善雄 : 水中の一般細菌数検定法に関する 2, 3 の検討. 日本水処理生物学会誌, **2** (2), 21-27 (1967)
- 19) Schmidt, G., and Thannhauser, S. J. : A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83-89 (1945)
- 20) 手塚泰彦 : 活性汚泥細菌に関する研究. 第 1 報 活性汚泥中の細菌数およびフロク形成細菌の分布. 日本水処理生物学会誌, **4** (1), 1-5 (1968)
- 21) 土屋隆夫・川原浩・井上亘 : 活性汚泥法による高 BOD 排水の処理について. 水処理技術, **7** (9), 1-8 (1966)
- 22) Ueda, S., and Earle, R. L. : Microflora of activated sludge. *J. gen. appl. Microbiol.*, **18**, 239-248 (1972)