水産廃水活性汚泥の微生物に関する研究
(第2報) すり身製造廃水活性汚泥の細菌相

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 - II.
Bacterial flora in waste activated sludge
of brayed fish flesh-production.

Akira HIRAISHI and Buhei ZENITANI
(Faculty of Fisheries, Nagasaki University)

は し が き

水産廃水活性汚泥は、魚臭を伴う高BODの廃水を基質とし、その管理・保持はかなり困難とされているにもかかわらず、生物学的処理の主役をなす細菌類についてはほとんど研究がなされていないようである。

水産加工廃水の活性汚泥法による処理を効果的に行ない、バルキングを抑制し、さらには余剰汚泥の餌飼料化を計るにしても微生物学的研究に待つところが大きい。

著者らは、先に汚泥フロック分散法と生菌数の測定法を検討(平石・銭谷:1977)したが、さらに汚泥フロック中の細菌相について研究した結果、主として coryneform と nocardioform の細菌類が優占する特異的な菌相を示す事実を明らかにしたので報告する。

実験材料および方法

1. 供試活性汚泥

長崎市京泊町長崎県水産加工センター、かまぼこ用すり身製造工場の総合廃水処理場から採取した活性汚泥を用いた。別に前報のように室内でバッチ式に馴養した夏季汚泥も供試した。

2. 汚泥フロックからの細菌の分離方法

細菌分離用の試料処理および培地は前報と同様である。培地は最高生菌数を得た活性汚泥抽出液添加 PPYE 培地を主に使用し、一部は他の計数培地も併用した。

混釈平板法で25~27°C, 7日間培養し生菌数を計数後、コロニー数が50~100程度の平板を適宜に選び、寒天表面上のコロニーからできるだけ釣菌した。分離細菌はPPYE培地を用いて常法に従って純粋分離し、同寒天斜

面培地に接種し保存した。

3. 分離菌株の性状検査法

当初、試験は一般常法によって実施したが多数の菌株を能率よく検査するため、必要な最少限の試験法について検討した結果、次の検査方式を採用した。

細胞形・運動性・グラム反応・ゼラチン液化および硝酸塩還元各試験には Ball & Sellers (1966) の多目的培地を用い、25°Cで培養し、グラム染色は15~36時間および5日間培養、他は6日間培養について観察した。OF試験は Hugh & Leifson (1964) 法により、25°Cと37°C(特に腸内細菌科)で6日間培養後判定したが、coryneform と nocardioform 細菌は2週間まで培養を延長した。酸素要求性はOF試験の6日間培養の結果で判定した。なお両培地の原法組成では発育がよくない菌株も存在したので、いずれも0.05%酵母エキスを補足して使用した。

PPYE寒天斜面培養について、チトクロームディスク(栄研)を用いたチトクロームオキシダーゼ反応(25°C, 2~3日培養)、色素生産(温度の影響があるので17, 25および37°Cで3日培養)および運動性菌株のべん毛染色(20°C, 18~48時間あるいは25°C, 15~24時間培養)の各試験を行なった。グラム反応が判定しにくい菌株はさらに PPYE 培地で培養、試験した。

多態を認めた菌株(coryneform や nocardioform)は、スライド培養(Ensign & Wolfe, 1964)によって形態変化を確認した。後者のフィラメント形成には液体培養の方が好結果をもたらす場合があり、28°Cで培養した。

Table 1. Scheme used for the identification of bacteria isolated from activated sludge

A	B	C	Characteristics			G	H	I	Assumed genera or families	Groups
R	—	—	+	Po	+	O			<i>Pseudomonas</i>	I
R	—	—	+	Pe	+	—	—		<i>Alcaligenes</i>	II
R	—	—	+	Pe	—	Fg			Enterobacteriaceae	III
R	—	—	+/-	Po/-	+	F/Fg			Vibrionaceae	IV
R	—	—	+/-	Pe/-	+	O/-	+		<i>Flavobacterium</i>	V
CR	—	—	—		+			—	<i>Moraxella</i>	VI
CR	—	—	—		—			—	<i>Acinetobacter</i>	VII
C/CR	—	—	—		+			+	<i>Paracoccus</i>	VIII
C	—	+				O/-			<i>Micrococcus</i>	IX
C	—	+				F			<i>Staphylococcus</i>	X
R	+								<i>Bacillus</i>	XI
RR	—	+ /v							<i>Corynebacterium</i>	XII
PR*	—	+ /v							<i>Arthrobacter</i>	XIII
PR**	—	+ /v							Nocardioform	
									Actinomycetes	XIV

Characteristics :

A Cells
B Endospore
C Gram-reaction
D Motility
E Flagella

F Cytochrome oxidase
G OF test
H Pigmentation
I Denitrification

Symbols :

R, rods; C, cocci; CR, coccobacilli; PR, pleomorphic rods;
PR*, coccoid in older culture; PR**, slender filamentous
rods, occasionally branched. v, variable.
Po, polar; Pe, peritrichous.
O, oxidative; F, fermentative; Fg, fermentation with gas.

この検査方式は3種の培地を用いるだけで、Table 1に示す細菌の群別に応用ができ、汚泥抽出液添加PPYE培地で分離した菌株の大部分に適用できた。

特定の群については別に追加性状試験を行なったが、*Arthrobacter* については、Mulder (1964) の 0.1%硝酸アンモニウム添加無機塩培地を基礎培地として、栄養要求・炭水化物からの酸生成・有機酸利用の各試験を実施し、発育因子要求株については0.02%酵母エキスを補足して試験した。トリブチリン分解は Hugo & Beveridge (1962) 法によった。カゼインとセルロース分解は基質含有 PPYE 培地、また尿素分解は Christensen 培地を用いて試験した。培養温度28°C。 *Bacillus* 属の同定には Wolf & Barker (1968) の方法をも参考にした。

4. 分離細菌の所属の同定

分離菌株はすべて好気的条件下で発育する従属栄養細菌であって、その所属判定は Bergey の分類 (Buchanan & Gibbons, 1974) により設定した Table 1 の検索形式によった。なお XIV 群のみは球状～球桿状に分断するフィラメントを形成し、nocardioform 放線菌 (Goodfellow, 1971) と群別した。

5. 純離菌株による廃水浄化試験

加熱・凝固タンパクを除去した廃水ロ液 (pH 7.2, COD 780ppm) 50ml を 500ml 三角フラスコに入れ加圧殺菌した。これに前培養液 (OD₆₆₀, 0.4~0.8) 1 ml を接種し、ロータリーシェーカー (高崎科学, TB-16T) で 28°C, 48時間振とう培養した。発育量は培養液の 660 nm における吸光度 (日立分光光度計 101型) をもって表わし、また COD はアルカリ性過マンガン酸カリウム法 (半谷, 1960) により 100°C, 30分間加熱で測定した。

実験結果

すり身製造廃水の処理場および室内の活性汚泥から計 932株の細菌を分離し、そのうち 902株 (約97%) の所属を判定し Table 2 に示した。すなわち処理場汚泥には nocardioform グループが約30%で最も多く、*Corynebacterium*・*Arthrobacter* の coryneform グループが約15%, *Bacillus* 13%, *Paracoccus* 11%と続き、他にグラム陰性細菌類が約22%であった。一方、室内汚泥では *Arthrobacter*・nocardioform グループが約46%, *Bacillus* 24%, *Pseudomonas* と *Alcaligenes* がそれぞれ10%弱を占めていた。

Table 2. Bacterial flora of activated sludge in plant and laboratory.

Organisms	Number of isolates			
	Plant		Laboratory	
<i>Pseudomonas</i>	20	5.8*	55	9.9*
<i>Alcaligenes</i>	20	5.8	53	9.5
Enterobacteriaceae	8	2.3	nd	—
Vibrionaceae	21	6.1	nd	—
<i>Flavobacterium</i>	nd	—	10	1.8
<i>Moraxella</i>	2	0.6	23	4.1
<i>Acinetobacter</i>	4	1.2	5	0.9
<i>Paracoccus</i>	38	11.0	8	1.4
<i>Micrococcus</i>	26	7.5	12	2.2
<i>Staphylococcus</i>	10	2.9	2	0.4
<i>Bacillus</i>	45	13.0	132	23.7
<i>Corynebacterium</i>	22	6.4	3	0.5
<i>Arthrobacter</i>	28	8.1	220	39.5
Nocardioform Actinomycetes	101	29.3	34	6.1
Total isolates	345	100	557	100

* Percentage of isolates per total identified isolates. nd: not detected.

室内汚泥について細菌相の変化を見ると、Table 3のように *Arthrobacter* が同化期に過半を占め、以後次第に減少する傾向を示した。内生呼吸期に移行するにつ

れて *Bacillus* や *Pseudomonas*・*Alcaligenes* などが増加したが、coryneform・nocardioform グループはなお30%検出された。これは当初MLSS 400ppm でやや高負荷でバッチ式に曝気した場合であるが、汚泥混液は当初 pH 7.6から8.3~8.4と次第にアルカリ性に変化し、曝気後約30時間で内生呼吸期に入り、COD除去率は3日後で約90%であった。

Table 3. Change of bacterial flora in laboratory-activated sludge

Organisms	Percentage of isolates	
	Assimilative	Endogenous
<i>Pseudomonas</i>	4.2	10.0
<i>Alcaligenes</i>	4.2	15.0
<i>Flavobacterium</i>	1.4	2.5
<i>Moraxella</i>	6.9	nd
<i>Acinetobacter</i>	nd	2.5
<i>Paracoccus</i>	1.4	5.0
<i>Micrococcus</i>	1.4	2.5
<i>Bacillus</i>	9.7	32.5
<i>Corynebacterium</i>	1.4	nd
<i>Arthrobacter</i>	62.5	15.0
Nocardioform Actinomycetes	6.9	15.0
No. of isolates	72	41

nd: not detected

Table 4. Characteristics of groups of asporogenous bacteria differentiated by routine tests

Characters	Groups													
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XII	XIII	XIV	
Cells	R	R	R	R	R	CR	CR	C /CR	C	C	PR	PR	PR	
Gram-reaction	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	22	182	74	
Motility	+	+	+	15	7	—	—	—	—	—	12	240	—	
Flagella	Po	Pe	Pe	Po	Pe						nd	nd		
Cytochrome oxidase	+	+	—	+	+	+	—	+	—	—	—	—	52	
Glucose metabolism by OF test														
Fermentative	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	110	
Oxidative	+	—	+	+	9	1	—	38	2	+	13	218	110	
Neutral or alkaline	—	+	—	—	1	24	+	8	36	—	12	30	25	
Gas	—	—	+	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Pigmentation	4	—	—	6	+	—	—	7	34	6	21	177	120	
Denitrification	40	1	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	
Nitrate reduction	+	45	+	+	+	7	5	+	+	+	12	235	12	
Gelatin liquefaction	+	45	—	+	7	—	—	—	35	6	12	190	122	
No. of isolates	75	73	8	21	10	25	9	46	38	12	25	248	135	

Symbols are the same as in Table 1. Numerals : number of positive isolates.

+, all positive ; —, all negative. nd, not determined.

これらの結果を全般的に見ると、汚泥内の主要細菌類は *coryneform*・*nocardioform* グループであって、4 回の分離試験でもこれらのグループが常に約半数ないしはそれ以上の検出率であった。次に *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* が多く分離された。

分離細菌のうち無孢子細菌の各群（属、一部は科）の特徴を Table 4 に示す。以下主な細菌類について述べる。と次のようである。

1. *coryneform* グループ

同化期に優占し最も多く分離された *Arthrobacter* は

Table 5. Groups of isolates identified as *Arthrobacter*

Characters	A	Group B
Motility	98*	87*
Pigmentation	67**	100***
Growth at 10°C	72	43
17°C	100	100
37°C	90	87
Growth on 5% NaCl	100	0
Hydrolysis of		
Gelatin	87	0
Casein	64	0
Tributyrin	92	40
Growth factor requirement	0	100
No. of isolates	218	30
Acid from		
glucose	100	0
mannose	92	nt
glycerol	100	nt
xylose	21	nt
rhamnose	1	nt
Utilization of		
acetate	99	100
propionate	89	100
butyrate	71	nt
lactate	95	87
citrate	100	7
malate	100	97
fumarate	100	67
No. of test strain	96	30

Catalase, ammonia from peptone and utilization of pyruvate were all positive, and urease, cellulose- and starch-hydrolysis negative.

* percentage of positive, ** cream to yellow and

*** yellowish brown. nt, not tested.

Table 5 の特徴を有し、発育因子を要求しない A 群と要求する B 群に大別された。

A 群は本属中の約88%を占め、クリーム～黄色色素を産生する菌株が多く、大部分は運動性で、ゼラチン液化・脱アミノ・硝酸塩還元の諸作用を有した。多糖類の分解性は認めなかったが、トリブチリン分解のリパーゼ活性は92%の菌株で認め、また低級脂肪酸や他の有機酸をよく利用した。発育因子を要求しない点からは、Bergey の分類では *A. simplex* あるいは *A. globiformis* と推定される菌株が含まれると考えられるが、特に前者に対する近縁株が多かった。

B 群は普通肉汁培地などの通常培地では発育が困難で、P P Y E 培地に植え継ぎをする際にもかなりの菌株が失われた。汚泥抽出液を添加するとよく発育したが、タンパク分解能を欠く。この群は *A. terregens* に共通する性状が多いけれども、37°Cにおける発育と運動性などで相違が認められた。

Corynebacterium は約7%検出され、*Brevibacterium* と認めるべき菌株も検出したが、*Corynebacterium* と一括した。

2. *nocardioform* 放線菌

黄色からオレンジ色の色素を生産し、20～100 μ の分岐したフィラメントを形成し、球状あるいは球桿状に分断され、形態学的には全く *Nocardia* に類似した。しかしグルコースを酵素的に利用するものが多く、またカタラーゼ活性の弱い菌株も存在し、すべてを *Nocardia* と確定できないので本報では“*nocardioform*”とした。これらの放線菌は現在のところ、S V I の高い汚泥に多く検出されており、タンパク分解能・脱アミノ作用を有する菌株が多いが、詳しい性状や汚泥性状との関係は別に検討中である。

3. *Bacillus* 属細菌

有孢子細菌 *Bacillus* は177株を分離した。従来から分離例も多いので (Pipes, 1966), 種名のみをあげておく。*B. cereus* は160株で、そのうち105株がフィラメントを形成する *B. cereus* var. *mycoides* であった。他に *B. licheniformis* や *B. subtilis* などが少数検出された。

4. *Pseudomonas*・*Alcaligenes* および *Paracoccus* 属細菌

これらグラム陰性細菌のうち2属は従来も下水汚泥などからかなり検出されており、多種類の有機物をよく利用できる。分離した *Paracoccus* は発育因子を要求せず、またゼラチンを液化しないので *P. denitrificans* に該当する。この菌がこのように活性汚泥から多く検出された例は見当らないようである。なお *Pseudomonas*

の53%が脱窒作用を示した。

次に主要な細菌群の代表菌株を用いて、すり身廃液中での発育およびCOD除去率を測定したところ、Table 6に示す結果が得られた。この実験条件では、対照とし

た活性汚泥混液の添加培養で除去率が84%、それに対して *Arthrobacter* spp. A群, *Paracoccus denitrificans* および *Pseudomonas* spp. が70%前後の除去率を示したが、他の供試菌株ではさらに低率であった。

Table 6. The reduction of COD in waste water by pure isolates

Organisms	No. of strain tested	Growth OD	Reduction of COD,%	pH final
<i>Pseudomonas</i> spp.	3	0.50-0.58	68-72	8.7-8.8
<i>Alcaligenes</i> spp.	3	0.36-0.44	55-56	8.5-8.6
<i>Paracoccus denitrificans</i>	3	0.47-0.49	69-71	8.4-8.5
<i>Bacillus cereus</i>	4	0.67-0.68	54-60	8.6-8.8
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	3	0.53-0.60	58-60	8.6-8.7
<i>Corynebacterium</i> spp.	3	0.28-0.31	58-59	8.4
<i>Arthrobacter</i> spp. Group A	18	0.73-0.88	68-74	8.6-8.8
Group B	3	0.69-0.73	54-57	8.5-8.6
Nocardioform Actinomycetes	10	0.24-0.46	50-59	8.3-8.6
Activated sludge suspension		0.55	84	7.9

Initial COD, 780 ppm and pH 7.2. Shaking culture for 48 hrs at 28°C.

考 察

この実験より得られたすり身製造廃水活性汚泥中の優占菌は coryneform・nocardioform の菌群であり、他の廃水の活性汚泥の細菌相と比較してみると、酪農廃水活性汚泥のそれと類似しているように思われる。Jasiewicz & Porges (1956) は同化期に *Bacillus* と *Bacterium* (分離した *B. healii* と *B. linens* は Bergey の分類, 1974では coryneform グループ) が優占すること、また Adamse (1968) は *Arthrobacter* 様の coryneform が優占することを報告している。他に多くの coryneform を活性汚泥から分離した例としては、Mulder (1964) が *Arthrobacter* を、三上ら (1966) は合成下水で *Aerobacter* sp. とともに *Corynebacterium* が主体を占めたとし、Benedict & Carlson (1971) は *Brevibacterium*, また Lighthart & Loew (1972) は沈降バイオマス中に彼らの4群 (coryneform-*Arthrobacter* and / or *Bacillus*) が多いことを報告している。

一方、活性汚泥中における放線菌の存在については研究が少ないが、Mckinney & Horwood (1952) がフロック形成菌として *Nocardia actinomorpha* を分離しており、また Lechevalier & Lechevalier (1974) が活性汚泥および発泡活性汚泥から多数の *Nocardia* を分離し、後者の場合には新種 *N. amarae* が普遍的に存在することを認めている。

処理場汚泥と室内汚泥とでは優占細菌の出現率に差異が認められたが、これは廃水負荷量、曝気法などの相違によるもので、coryneform・nocardioform グループ内の変動にすぎないようである。処理現場の汚泥は、高BODの廃水が絶えず流入・負荷されており、そのためややバルキングの傾向にあり、室内汚泥に比べて活性の弱い菌株が多いように思われる。

このようにすり身廃水活性汚泥中に coryneform と nocardioform 細菌が優占する事実は、一般下水汚泥とは異なるかなり特異性のあることと考えられる。

ま と め

1. すり身製造廃水活性汚泥の細菌相に関して、検査・同定方式を設定し、分離菌株の約97%の所属を推定し得た。
2. 分離細菌は14群に大別され、coryneform細菌・nocardioform 放線菌, *Bacillus*, *Pseudomonas* および *Alcaligenes* などが主なるものであった。
3. 実験的には coryneform, 特に *Arthrobacter* が最優占し、廃水中のCOD除去能力も高かった。

謝 辞

この研究を実施するに当り、終始試料の採取など多大の御便宜を与えられた、長崎県水産加工業協同組合工場長松本政治氏、同谷川昭夫部長、多比良純一氏に深謝の意を表します。また、実験に協力された松村秀一氏に対

しても厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Adamse, A.D. : Formation and final composition of the bacterial flora of dairy waste activated sludge. *Water Res.*, **2**, 665 (1968)
- 2) Ball, R. J., and Sellers, W. : Improved motility medium. *Appl. Microbiol.*, **14**, 670 (1966)
- 3) Benedict, R. G., and Carlson, D. A. : Aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. *Water Res.*, **5**, 1023 (1971)
- 4) Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 5) Ensign, J. C., and Wolfe, R. S. : Nutritional control of morphogenesis in *Arthrobacter crystall-
opointes*. *J. Bacteriol.*, **87**, 924 (1964)
- 6) Goodfellow, M. : Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. gen. Microbiol.*, **69**, 33 (1971)
- 7) 半谷 高久 : 水質 調査法, 丸善, 東京, 271~274 (1966)
- 8) 平石 明・銭谷武平 : 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, 日本水処理生物誌, **13**(2), 1(1977)
- 9) Hugh, R., and Leifson, E. : The taxonomic significans of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, **66**, 24 (1953)
- 10) Hugo, W. B., and Beveridge, E. G. : A quantitative and qualitative study of the lipolytic activity of single strains of seven bacterial species. *J. appl. Bacteriol.*, **25**, 72 (1962)
- 11) Jasewicz, L., and Porges, N. : Biochemical oxidation of dairy waste VI. Isolation and study of sludge microorganisms. *Sewage Ind. Wastes*, **28**, 1130 (1956)
- 12) Lechevalier, M. P., and Lechevalier, H. A. : *Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foaming activated sludge. *Int. J. syst. Bacteriol.*, **24**, 278 (1974)
- 13) Lighthart, B., and Loew, G. A. : Identification key for bacteria clusters from an activated sludge plant. *J. Water Pollut. Con. Fed.*, **44**, 2078 (1972)
- 14) McKinney, R. E., and Horwood, M. P. : Fundamental approach to the activated sludge process I. Floc-producing bacteria. *Sewage Ind. Wastes*, **24**, 117 (1952)
- 15) 三上栄一・福岡誠一・小野英男・江藤穂積 : 特殊産業廃水の微生物処理に関する研究, 4, 活性汚泥のミクロフローラ. 醸工, **44**, 405 (1966)
- 16) Mulder, E. G. : *Arthrobacter*. Principles and applications in aquatic microbiology. Ed. by H. Heukelekian and N. C. Dondero. John Wiley & Sons, Inc. New York. London. 254-79 (1964)
- 17) Pipes, W. O. : The ecological approach to the study of activated sludge. *Ad. appl. Microbiol.*, **8**, 77 (1966)
- 18) Wolf, J., and Barker, A. N. : The genus *Bacillus* : Aids to the identification of its species. Identification methods for microbiologists 2, Part B. Ed. by Gibbs, B. M., and Shapton, D.A. Acad. Press. London. New York. 93-109 (1968)