HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低温下における廃水処理の微生物学的研究：（第２報）人工活性汚泥の育成と澱粉廃水処理能
Author(s)	渡部, 宏臣; 吉田, 忠; 高尾, 彰一
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 11(1), 95-101
Issue Date	1978-07-28
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11906
Type	bulletin (article)
File Information	11(1)_p95-101.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温下における廃水処理の微生物学的研究

(第2報) 人工活性汚泥の育成と澱粉廃水処理能

渡部宏臣*・吉田　忠・高尾彰一
(北海道大学農学部農芸化学科応用菌学講座)

(昭和52年8月22日受理)

Microbiological Studies on Waste Water Treatment at Low-temperature

(II) Development of artificial activated sludge and its ability to treat potato starch waste water

Hiroomi WATABE*, Tadashi YOSHIDA and Shoichi TAKAO
(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒　言

寒冷地における各種廃水の微生物的処理法を確立する基礎として，まず，低温における澱粉廃水処理をとり上げ，前報[10]では活性汚泥を低温 (13°C) で澱粉廃水に馴養した上，馴養前後における活性汚泥中の微生物相の変化から，酵母の1種 *Trichosporon cutaneum* がこの種の廃水処理に重要な役割を果たし得ること，この酵母を中心とし，Achromobacteraceae 科の細菌とともに活性汚泥を育成すれば効果的であることを推測した。そこでつぎに，馴養後の活性汚泥から純粋分離した *T. cutaneum* および数種の細菌の中から，フロック形成能の高い菌株を選択し，これを用いて人工活性汚泥の育成をはかり，低温における澱粉廃水処理の可能性を検討したので，それらの結果を報告する。

実験材料および方法

1. フロック形成試験

1) 使用菌株

低温 (13°C) で澱粉廃水に馴養した活性汚泥から純粋分離した *T. cutanum* 36株と Achromobacteraceae 科を含む細菌6属69株について，フロック形成試験を行った。

2) 試験用培地

Table 1 に示す3種を用いた。

3) 試験方法

培地 20 mℓ を入れて滅菌した大型試験管に，各菌株の斜面培養から約 10^5 cells/mℓ となるように接種し，27°C で2〜4日間振盪培養した後，フロック形成の有無を肉眼的に観察した

Table 1. Media for floc formation test.

Medium	Component
PYE[6]	Polypeptone 0.5%, yeast extract 0.1 %, pH 7.2
PME[2]	Polypeptone 0.1%, meat extract 0.05%, K_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.05%, pH 7.0
PGY[9]	Polypeptone 0.1%, glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, pH 7.0

* 現勤務先　明治製菓株式会社中央研究所
Central Research Laboratories, Meiji Seika Kaisha Ltd., Yokohama, Japan.

2. 人工活性汚泥の育成

1) 使用菌株

前項1の試験においてフロック形成能の良かった *T. cutaneum* II-1 および *Achromobacter* sp. II-55 株を用いた。

2) 菌体培養および活性汚泥の育成

前項1において用いた培地のうち PYE 培地を細菌用に，PGY 培地を酵母用とし，27°C，4日間振盪培養後，集菌 (12,000×g, 10分, 5°C) し，滅菌水による洗滌を2回行った後，これを活性汚泥の種菌とした。

人工活性汚泥の育成には，前報で用いた通気培養装置を3組用意し，Table 2 に示すように，I, II, III 各槽に種菌を添加し，これに澱粉廃水を加えて総量2ℓとし通気した。

菌体添加量は *T. cutaneum* は 10^6 cells/mℓ, *Achromobacter* sp. は 10^7 cells/mℓ 程度の生菌数とした。

澱粉廃水としては馬鈴薯の搾汁を静置沈澱した上澄液を用い，育成中の廃水添加量は，はじめ COD 値 200 ppm とし，次第に 400 ppm にまで増加した。

育成は，まず室温 (24°C) で行い，活性汚泥の充分な発育が認められた後，通気を一旦停止し，汚泥を沈降させて上澄液を捨て，再び澱粉廃水を加えて通気，馴養を続けた。この操作を毎日くり返し，育成開始60日後に槽内の温度を低温 (13°C) に下げ，さらに馴養を続けた。

Table 2. Microorganisms used for artificial activated sludge.

Batch No.	Microorganisms
I	*Trichosporon cutaneum* (10^6 cells/mℓ)
II	*Achromobacter* sp. (10^7 cells/mℓ)
III	*T. cutaneum* and *Achromobacter* sp.

3) 人工活性汚泥の微生物相

育成期間中における人工活性汚泥の微生物相は，前報[10]と同様，酵母および細菌について稀釈平板培養を行い生菌数を測定した。*Trichosporon* の生菌数は，平板上のコロニーの外観と直接検鏡により判別し計測した。また，同時に顕微鏡による汚泥フロックの観察も行った。

4) 澱粉廃水処理能

人工活性汚泥による澱粉廃水処理効果は，前報[10]と同様に過マンガン酸カリによる COD を測定し，COD 除去率で示した。

結果および考察

1. フロック形成試験

フロック形成試験の結果を Table 3 に示した。供試した *T. cutaneum* 36株は，用いた培地のいずれにおいてもよくフロックを形成し，この酵母が高いフロック形試能を有することがわかった。細菌6属69種のうち，*Flavobacterium* に属するものは全くフロックを形成せず，*Alcaligenes* の形成能も低かった。*Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* 3属の細菌には，フロックを形成するものも認められたが，培地の種類によって形成しない場合もあり，これらのフロック形成能は安定なものとはいえない。これらに対して，*Achromobacter* 属菌は35株のうち4株がいずれの培地でもフロックをよく形成した。

T. cutaneum 36株および *Achromobacter* 4株については，さらに，さきの3種の培地 (50 mℓ) による 500 mℓ 容坂口フラスコを用いた振盪培養でも試験したが，いずれの培地でもフロックをよく形成した。したがってフロック形成の点からは，*T. cutaneum* および

Table 3. Floc formation test.

Microorganisms		Tested strains	Floc-forming strains		
			PYE	PME	PGY
Yeast	*Trichosporon cutaneum*	36	36	36	36
Bacteria					
	Pseudomonas	2	1	1	1
	Alcaligenes	8	1	1	0
	Achromobacter	35	10	9	6
	Flavobacterium	10	0	0	0
	Arthrobacter	10	1	2	6
	Bacillus	4	2	2	1

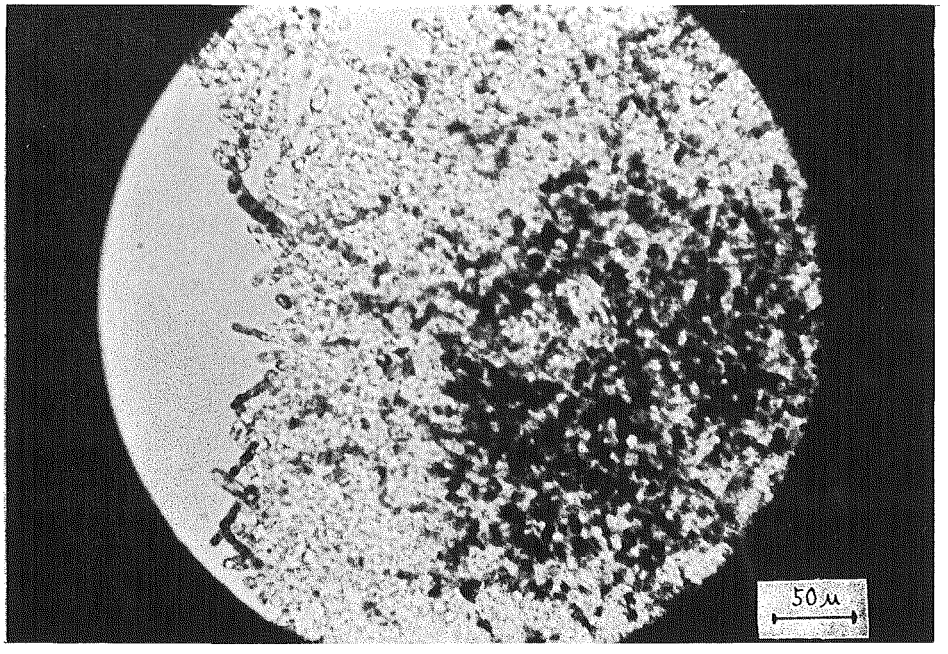

Fig. 1. Activated sludge floc developed from *Trichosporon cutaneum.*

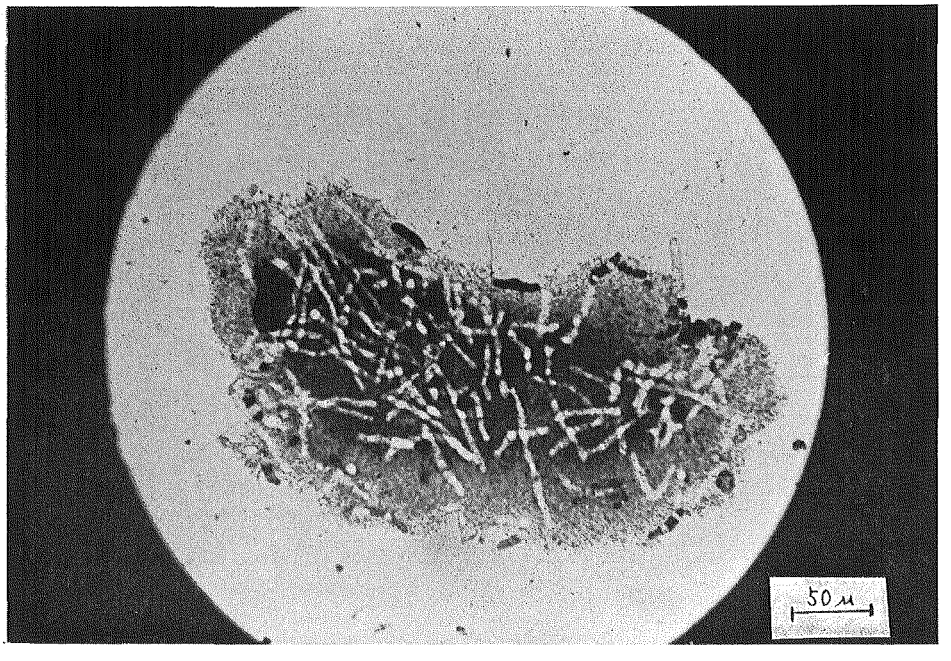

Fig. 2. Activated sludge floc developed from *Achromobacter* sp.

Achromobacter 属4株の利用が可能と考えられた。

T. cutaneum については，BECKER ら[3] および COOKE ら[4] によって活性汚泥中における重要性が指摘されているが，詳細な研究は全く行われていない。*Achromobacter* およびその類縁菌をフロック形成菌として報告したものには，ALLEN[1]，KIUCHI ら[7]，UEDA ら[11] などがあるが，活性汚泥から分離した *Zoogloea* 以外の細菌でも，長時間の通気により，有機物消費後にフロックを形成するとの MCKINNEY ら[8] の報告もある一方，UEDA ら[11] によってフロック形成良好とされた *Achromobacter pestifer* が，むしろフロック形成阻害菌であった[7] こともあり，定説はない。

2. 人工活性汚泥の育成

T. cutaneum および *Achromobacter* sp. の培養菌体をそれぞれ単独に用いた培養槽 I および II と，両者を混合して用いた培養槽 III について，澱粉廃水を加えながら通気し，まず室温で活性汚泥の育成をはかったがいずれの培養槽でも10日前後の育成で容易に活性汚泥フロックの形成が認められた。これらのフロックを顕微鏡観察したところ，*T. cutaneum* を添加した培養槽 I および III の汚泥は，ほとんどが *T. cutaneum* 菌体の強固な塊りを中心としていることが明らかに認められ (Fig. 1)，さらに，*Achromobacter* sp. を主とした培養槽 II の汚泥においても，混入したと見られる酵母 (純粋分離後，*T. cutaneum* であることを確認) と細菌によるフロックが認められた (Fig. 2)。このような状態は，育成期間中はもちろん，低温へと系を移したあとでもほとんど変らず，*T. cutaneum* を中心としたフロックが著しく安定であることを示している。

1) 人工活性汚泥育成中における微生物相の変化

人工活性汚泥を室温で育成した36日間の酵母および細菌の生菌数変化を Fig. 3 に示した。

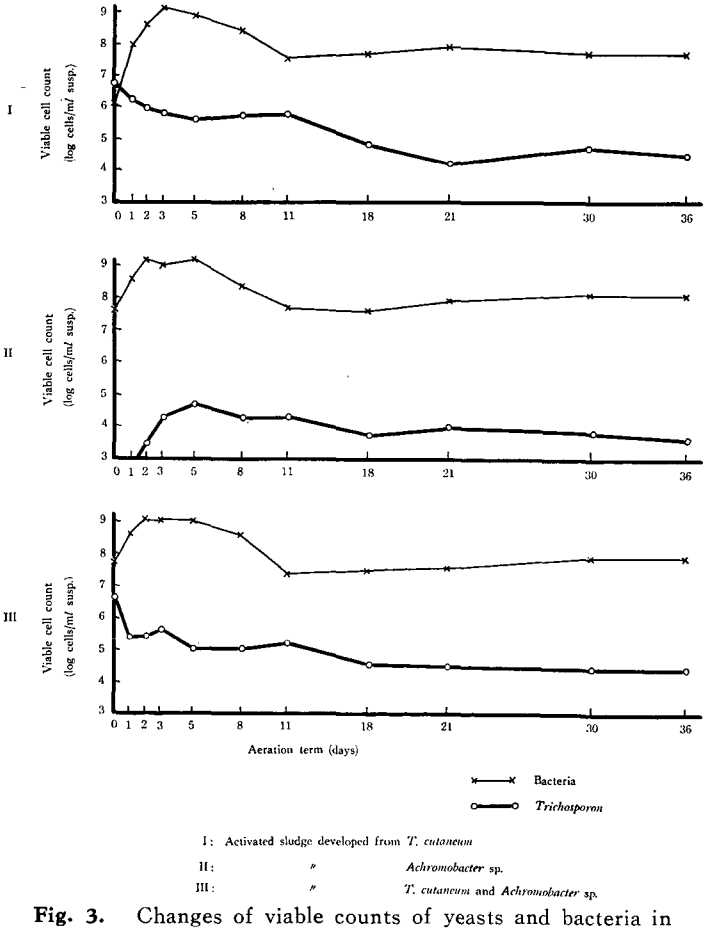

Fig. 3. Changes of viable counts of yeasts and bacteria in artificial activated sludge.

T. cutaneum 単独使用の培養槽 I では，*Trichosporon* の生菌数は，育成の初期に幾分減少するが，2～3 週間でほぼ 10^5 cells/mℓ の一定値となり，以後ほとんど変らなかった。また，この槽で細菌は，澱粉廃水などから自然混入したものと思われるが，最初 10^6 cells/mℓ から 2～3 日間に急激に増加して 10^9 cells/mℓ に達した後，10 日前後に 10^7 cells/mℓ 程度にまで減少し，以後安定するという経過を示した。

Achromobacter sp. の純粋培養から育成した培養槽 II では，細菌は培養槽 I と同様，数日中に 10^9 cells/mℓ にまで増加し，10 日前後には 10^7 cells/mℓ 程度に下がり以後安定した。また，この槽では，廃水などから自然混入したと思われる *Trichosporon* が，最初 10^2 cells/mℓ 程度存在していたが，数日後には 10^4 cells/mℓ に達した後，2 週間程の間に 10^3 cells/mℓ の安定したレベルを保つようになった。

T. cutaneum および *Achromobacter* sp. 両者を混合して育成した培養槽 III の場合も，上記 2 槽の場合とほぼ同じ経過を示し，数日間の変動期を経て約 2 週間後には細菌が 10^7 cells/mℓ，*Trichosphoron* が 10^4 cells/mℓ 程度の生菌数に落着いた。

36 日以後の生菌数変化を示すグラフは省略したが，2 カ月経過後，各槽を低温に移して馴養を続けても，*Trichosporon* および細菌の生菌数はほとんど変らず，ほぼ同じ値を保ち，育成した活性汚泥が非常に安定であることが明らかとなった。

2) 人工活性汚泥育成中の澱粉廃水処理能

上記 3 槽の人工活性汚泥育成中における澱粉廃水処理能を Fig. 4 に示した。すなわち，I, II, III 各槽について，室温育成 30 日後，45 日後，60 日後，および同日低温に移した直後，低温に移して 15 日後（育成通算 75 日後），30 日後（同 90 日後）にそれぞれ澱粉廃水を負荷して，2, 4, 6 時間後に測定した COD 除去率をグラフとしてある。

室温において汚泥が充分発育し，菌数が安定した 30 日後，*T. cutaneum* を用いた培養槽 I では，澱粉廃水負荷 2 時間後に 80%，6 時間後に 90% の高い COD 除去率を示し，充分の処理能をもつ汚泥となっていることがわかったが，その後も除去能は次第に高まり，60 日後には，負荷 2 時間後で 86%，6 時間後で 92% 以上に達した。さらに，これを低温に移した場合，室温の時にくらべて廃水処理能の低下もなく，負荷 4 時間後で 90% 以上の COD 除去率を示し，その後も安定した高い除去能を保った。

Achromobacter sp. の細菌を用いた培養槽 II の場合は，菌数の安定した 30 日後においても除去能はかなり

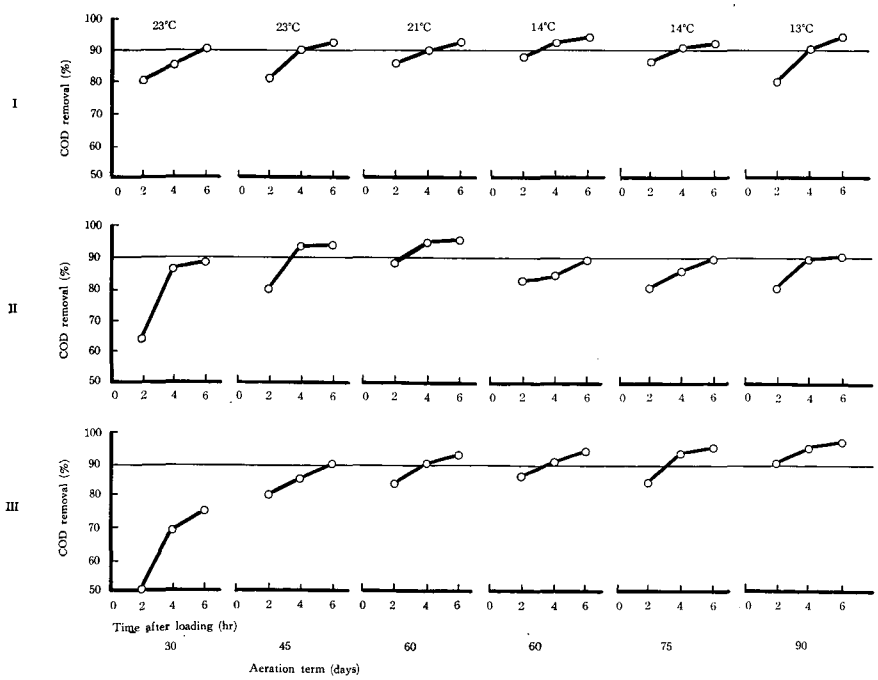

Fig. 4. Changes of COD removals by artificial activated sludge.

低く，負荷2時間後で64%，6時間後でも80%台のCOD除去率を示すに過ぎなかった。その後の育成により，除去能は次第に高まり，60日後には負荷2時間後88%，4時間後には95%の除去率を示すにいたった。しかし，この槽の場合は，育成60日後に低温に移したところ，除去能は低下し，負荷2時間後で83%，6時間後でも90%に満たない除去率となった。これをさらに馴養し続けたところ，低温に移して30日後（育成90日後）にはほぼ回復し，高い除去率を示すようになった。

T. cutaneum と *Achromobacter* sp. 両者混合の場合（III），30日後の除去能は低く，負荷6時間後においても75%の除去率を示すに過ぎなかったが，育成を続けることによって処理能は次第に高くなり，60日後には負荷2時間後に84%，6時間後で93%の高いCOD除去率を示すにいたった。さらにこれを低温に移しても処理能は低下することなく，90日後には，負荷2時間後に90%，6時間後には97%の高い除去能をもつ汚泥となった。

いずれの活性汚泥についても，低温に移した直後に沈降性が悪くなる傾向が認められたが，*T. cutaneum* を種として育成した活性汚泥では回復が著しく早く，安定な汚泥となった。また，*Achromobacter* sp. を種とした培養槽IIでは，室温においては *Geotrichum* の発生する場合が多く，低温移行後には *Cladosporium* の生育が認められたが，*T. cutaneum* を用いた培養槽IおよびIIIでは，このような傾向はほとんどなかった。

太宰ら[5]は，振盪培養によって活性汚泥を5日間，澱粉廃水に馴養後，その浄化能に対する温度の影響をしらべ，20～35°Cでは95%のCODを除去するが，15°Cでは活性が約10%低下し，7°Cでは約20%，3°Cでは約25%の低下を見，7°Cおよび3°Cでは処理水が混濁すると報告している。

T. cutaneum および *Achromobacter* sp. をそれぞれ単独に，または混合して用いたこの実験では，24°Cで育成開始後，生菌数が一定レベルに落着くまでに約10日間を要し，安定した高い処理能をもつようになるまでに約2カ月を費したが，この段階で，13°Cの低温に移した場合，*Achromobacter* sp. から出発した汚泥にかなりの処理能低下を見た。しかし，*T. cutaneum* を種としたものでは，低温の影響をほとんど受けず，この程度の低温では，馴養活性汚泥が室温におけると同様の浄化能を発揮し得ることが認められた。

これらの結果から，低温における澱粉廃水処理には，*T. cutaneum* を主体として育成した活性汚泥が極めて有効であると判断したが，寒冷地における澱粉廃水の処理が厳冬期に行われることを考慮すれば，さらに低温での効果が問題である。この点については次報に記述する予定である。

終りに，本研究費の一部は昭和50年度文部省科学研究費，特定研究「微生物による環境浄化」によったことを付記し，感謝の意を表する。

要　　約

1. 低温（13°C）で澱粉廃水に馴養した活性汚泥から分離した酵母の1種，*Trichosporon cutaneum* 36株および細菌6属69株について，3種の液体培地を用いた振盪培養によるフロック形成試験を行った結果，*T. cutaneum* 36株はいずれもフロックをよく形成し，細菌では *Achromobacter* に属する4株が良好なフロック形成菌であった。

2. これらのうちから，フロック形成能の優れていた *T. cutaneum* および *Achromobacter* sp. 各1株を用いて人工活性汚泥の育成を行った。すなわち，*T. cutaneum* を種として用いた培養槽I，*Achromobacter* sp. を用いた培養槽II，両者を混用した培養槽IIIを準備し澱粉廃水を加えて通気しながら，始め室温（24°C）で，後，低温（13°C）として活性汚泥を育成した。

3. その結果，いずれの培養槽においても，室温培養10日前後で容易に活性汚泥のフロックが形成され，酵母（*T. cutaneum* と同定）がフロックの中心となっていることを顕微鏡的に確認した。

4. 各槽で育成中の人工活性汚泥について，*Trichosporon* および細菌の生菌数変化をしらべたところ，いずれの汚泥においても，培養開始後約2週間で一定の菌数を示すようになり，2カ月後に低温に移しても，それぞれの生菌数はほとんど変らず，育成した活性汚泥が非常に安定であることが認められた。

5. 各槽の活性汚泥について，育成期間中の澱粉廃水処理能をCOD除去率でしらべたところ，室温での育成2カ月後には，いずれも，負荷2時間後に80%台，6時間後に90%をこえる高い除去能をもつようになった。これを低温に移した場合，*T. cutanum* を用いた培養槽Iおよび両者混用の培養槽IIIでは，処理能は低下することなく，沈降性もすぐれ，安定した活性汚泥となっていることが確められた。しかし，*Achromobacter* sp. のみを種菌とした培養槽IIの汚泥では，これを低温に移すことによって，一時，COD除去率がかなり低下し，かつ，沈降性も悪化し，低温下での良好な処理能を回復

するまでに約30日を要した。

6. これらの結果から，低温における澱粉廃水処理には，*T. cutaneum* を中心として育成した活性汚泥が効果的と考えられた。

引用文献

1. ALLEN, L. A.: The bacteriology of activated sludge, *J. Hyg.*, **43**: 424-431. 1944
2. ANGELBECK, D. I. and KIRSCH, E. J.: Influence of pH and metal cations on aggregative growth of non-slime-forming strains of *Zoogloea ramigera*, *Appl. Microbiol.*, **17**: 435-440. 1969
3. BECKER, J. G. and SHAW, C. G.: Fungi in domestic sewage-treatment plants, *Appl. Microbiol.*, **3**: 173-180. 1955
4. COOKE, W. B., PHAFF, H. J., MILLER, M. W., SHIFRINE, M., and KNAPP, E. P.: Yeasts in polluted water and sewage, *Mycologia*, **52**: 210-230. 1960
5. 太宰宙朗・小川 誠・小野英男： 活性スラッジによる産業廃水の処理に関する研究 (9), 澱粉廃水の処理について, 醗工, **43**: 409-415. 1965
6. DIAS, F. F. and BHAT, J. V.: Microbial ecology of activated sludge I. Dominant bacteria, *Appl. Microbiol.*, **12**: 412-417. 1964
7. KIUCHI, K., KURAISHI, H., MUROOKA, H., AIDA, K., and UEMURA, T.: Floc formation in activated sludge I. Floc-forming activities of representative bacteria isolated from activated sludge, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Tokyo, **14**: 387-397. 1968
8. MCKINNEY, R. E. and WEICHLEIN, R. G.: Isolation of floc-producing bacteria from activated sludge, *Appl. Microbiol.*, **1**: 259-261. 1953
9. PIKE, E. B., CARRINGTON, E. G., and ASHBURNER, P. A.: An evaluation of procedures for enumerating bacteria in activated sludge, *J. appl. Bact.*, **35**: 309-321. 1972
10. 高尾彰一・吉田 忠・渡部宏臣： 低温下における廃水処理の微生物学的研究 (I) 澱粉廃水処理における微生物相, 北大農邦文紀, **10**: 261-271. 1977
11. UEDA, S. and EARLE, R. L.: Microflora of activated sludge, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**: 239-248. 1972

Summary

Floc-forming strains of yeast (*Trichosporon cutaneum*) and bacteria (*Achromobacter* sp.), both of which were isolated from activated sludge adapted to starch waste at low-temperature (13°C), were selected and employed to develop an effective artificial activated sludge for the treatment of potato starch waste water under cool weather conditions.

The artificial activated sludge was seeded and bred in each aeration unit with *T. cutaneum* (fermenter I), *Achromobacter* sp. (fermenter II) and with both pure cultures (fermenter III) at room temperature, fed starch waste daily, and then acclimated to low-temperature.

In each system, favorable flocs were formed during the first 10 days. It was confirmed under the microscope that the center part of these flocs was mostly composed of a compact mass of yeast cells, which was identified as *T. cutaneum*.

The activated sludge in fermenters I and III demonstrated a higher rate and stable activities of COD removal and superior floc sedimentation at low-temperature when compared with that in fermenter II with *Achromobacter* sp. only. Hence, it is considered that the artificial activated sludge with *T. cutaneum* is much more effective on starch waste treatment under cool weather conditions.