

# バイオオーギュメンテーションを 用いた廃水処理技術の検討

Analysis of waste water treatment by bioaugmentation

田中 孝国・福井 悠太\*

Takakuni TANAKA and Yuta FUKUI

## 1. 緒言

活性汚泥法は、多種多様な廃水処理に使用される極めて処理能力の高い廃水処理技術である。しかし、難分解性汚染物質が活性汚泥槽に流入した場合、分解に時間がかかる(馴養期間が必要)、もしくは分解できない(活性汚泥が死滅する)という報告例がある<sup>1-3)</sup>。その対応策として、対象の汚染物質の分解能力が既に確認されている特定の菌株を活性汚泥に導入(添加)する方法がある。これは生物添加法(バイオオーギュメンテーション)と呼ばれ、難分解性物質を安定的に分解する方法である<sup>1)</sup>。

しかし、バイオオーギュメンテーションは、2つの問題を持っている。第1点目は、添加菌が活性汚泥中に定着出来ずに(微生物群集と共存出来ずに)淘汰されてしまう、もしくは分解が進まなくなる現象である。2点目は、もともと存在していない微生物群集に添加菌が入ることで微生物間に遺伝子相互作用が起こり、生態系が乱れる危険性が生じることである<sup>2)</sup>。廃水の種類によって多種多様な添加菌が用いられるため特性が絞り込めず、これらの問題を予測することは困難である。そのため、バイオオーギュメンテーションの実証試験を行いデータの収集を予め行っておく事が必須である<sup>8)</sup>。

そこで本研究では、トルエン分解菌である *Pseudomonas putida* TN1032 を活性汚泥に添加し、難分解性汚染物質としてトルエン類似物質(トルイル酸)の分解実験を行った。そして、前報<sup>3)</sup>の活性汚泥のみの場合と比べて、バイオオーギュメンテーションの有効性について考察を行った。

その結果、バイオオーギュメンテーションでは、ラグタイムなく難分解性物質が分解されることがわかった。更に、難分解性物質の分解能力は、添

加した細菌の特性に強く依存していた。今回の結果より、難分解性物質分解菌を活性汚泥に添加することで、迅速分解が期待できるということが判明したので報告する。

## 2. 実験方法

バイオオーギュメンテーションに用いた *Pseudomonas putida* TN1032(TOL)(以降、*P.putida* と略す)は、TOLプラスミドを持つトルエン分解菌である。この菌の示すトルエン分解経路の初期段階にトルエン→トルイル酸の経路があるため今回実験に採用した。また、この菌は土壌細菌であるため、生息温度等の培養条件は活性汚泥とほぼ同じである(25-30℃)<sup>4)</sup>。

実験に用いた活性汚泥は、前報<sup>3)</sup>と同様の実験室馴養汚泥(ポリペプトン及びグルコースで培養、MLSS [g-dry cells/L] は常時2000~3000)である。*P. putida* は、トルイル酸を主炭素源(0.8g/L=800ppm)とした模擬廃水培地<sup>3)</sup>で前培養を行った。尚、*P. putida* は模擬廃水を培地とした場合、約12時間で増殖のピークを迎え、細菌の増殖を示すOD660が1.0を示し、細菌の乾燥重量は0.34になる換算式が判明している<sup>5)</sup>。

緒言にもあるように、バイオオーギュメンテーションの実験では、添加した細菌が定着できずに流出するという問題点がある。よって、混合培養系に別の細菌を添加し定着した報告例<sup>6)</sup>を参考にして、活性汚泥に対して *P.putida* を10重量%(乾燥重量で計算)の割合で添加した。

まず、活性汚泥及び *P. putida* の細菌濃度を計算した。活性汚泥のMLSSは2.5g/L、12時間前培養を行った *P. putida* は0.27g/L (OD660 =0.8)であったことから、活性汚泥0.4L及び *P. putida* 0.1Lを Fig.1の装置(5Lサイズのジャーファーメンター)に移した。続いて、トルイル酸を主炭素源とする模擬廃水2.5Lを加えて総量を3.0Lにし、分解実験

を開始した。培養条件は、25°C、攪拌速度200rpm、通気量は5L/minで行った。この模擬廃水を毎日 fill and draw法(30min沈降させて、上澄みを抜き取り新鮮な培地を入れる)にてトルイル酸濃度が800ppmになるように供給した。模擬廃水分解実験中は、汚泥濃度MLSS (OD660を乾燥重量で換算 [g-dry cells/L])、トルイル酸濃度(分光光度計OD275、検量線を用いて換算 [g/L])、pH、DO (溶存酸素濃度mg/L) を測定した。更に、培養液の代謝活性の判断指標として、0、2、4、6日目の培養液を50mL抜き出して遠心(3000rpm)を行って回収し、模擬廃液と活性汚泥を馴養した培地を用いて培地の違いによる酸素利用速度の変化をDOセンサーでそれぞれ測定した。



Fig.1 バイオオーギュメンテーション装置図

### 3. 結果と考察

活性汚泥によるトルイル酸分解の測定結果をFig. 2に示した。このグラフを見ると、ラグタイム無くトルイル酸の分解が開始されたことがわかった。活性汚泥のみの分解実験の際は、約1日間のラグタイム後に難分解性物質分解菌が増殖し分解を開始していた<sup>3)</sup>。よってトルイル酸を主汚染源とした場合、活性汚泥に*P. putida*を添加したバイオオーギュメンテーションは、即時分解が可能であることが確認出来た。最終的なトルイル酸濃度も活性汚泥のみの場合と比べて、分解後の分解値が低くなる傾向が見られた(定量的なデータとしては得られなかった)。Fig.2中の培養開始2日目のMLSSの増加はラグタイムを終えた後の活性汚泥中の分解菌の増殖と考えられた。2日目以降のMLSSが安定しなかった理由として、*P. putida*と

活性汚泥中の複数のトルイル酸分解菌が餌であるトルイル酸を巡って競合状態<sup>7)</sup>を起し、培養終了まで両方とも存在比や増殖比が一定にならなかった可能性が考えられた。

Fig. 3はバイオオーギュメンテーションの増殖速度及びトルイル酸の分解速度の経日変化を示したグラフである。トルイル酸分解速度は添加直後から安定した値を示すことがわかった。グラフ中の2日目の急激な上昇はFig.2のMLSSの上昇の理由と連動したものと考えられた。2日目以降、大きな分解速度の変動は無かった。このバイオオーギュメンテーションの分解速度と活性汚泥のみの場合<sup>3)</sup>を比較してみると、数値的にはほとんど変化が無かった。これは増殖速度に関しても同様であった。これは、分解プラスミドの伝達などの現象<sup>10)</sup>が起きていないことも示していた。よって、このグラフからは、バイオオーギュメンテーションの重要な部分は初期段階(活性汚泥が難分解性物質に馴養されるまで)のみで、それ以降は活性汚泥のみの場合とほぼ変わらなくなることが示唆された。また、Fig.2では10日目のMLSSが減少していたが、Fig.3では10日目の増殖速度の急激な上昇が見られた。理由はおそらく*P. putida*か、競合している活性汚泥中の分解菌のどちらかが装置外へ排出されてしまい(消長した)、排出されなかった細菌の増殖速度が増加したことによるものと考えられた。11日目の増殖速度が急激に減少した明確な理由については不明である。ただし、添加菌が消長するパターンとして、稲森らの報告<sup>7)</sup>によればこの例は、汚染化学物質に対する添加細菌実験でしばしば見られる、“基質が分解されて無くなると細菌消失”パターンであるとされている。この報告を基に考察すると、分解菌が異常増殖したことで基質が急速に枯渇し、分解菌が活性汚泥のフロック(凝集)から遊離して培地交換の際に上澄みに浮遊し、装置外に排出された可能性が考えられた。もしくは、今回採用した*P. putida*の添加割合が適正では無かったことが考えられた。今後、この点について検討が必要である。

Fig.4は、酸素消費速度及び菌体収率 $Y_{x/s}$ (単位時間辺りの、菌体増殖量÷トルイル酸分解量= $Y_{x/s}$ )を示した。酸素消費速度、菌体収率ともに、10日目に大きく増加し、11日目に減少傾向を示した。この結果も前述のFig.3の結果を裏付けて

いる。菌体収率は、活性汚泥のみの場合と比べ約半分であった。*P. putida*の添加/増殖による活性汚泥中の分解菌の抑制によるものと考えられた。これは、*P. putida*が活性汚泥に対して強い影響を持たず、トルイル酸の分解を制御しているのは活性汚泥である、ということを示している。

Fig.3、4の結果より、今回のバイオオーギュメンテーションは見かけ上10日間は活性汚泥の生態系バランスをとっていることがわかった。この結果については、装置内外に存在する細菌の種別の判明が必要である。

Table 1は、培養0、2、4、6日目のバイオオーギュメンテーションの細菌群の代謝活性を酸素消費速度で計測した表である。これを見ると、2日目には急激にトルイル酸の分解活性が上昇していることがわかる。しかし、この表からはトルイル酸を分解すると同時にグルコースを分解する細菌も同時に存在しており、その代謝活性が連動していることしか判明しなかった。この実験は、活性汚泥を遠心して集菌する必要があるため、測定時に活性汚泥が再分散しにくく誤差が入っていると考えられる。よって今後、データを集積して標準偏差によって再検討するか、代謝活性の評価手段を変える必要がある。

#### 4. まとめ

今回行ったバイオオーギュメンテーションは、活性汚泥のみの場合と比べるとラグタイム無くトルイル酸の分解を行うことがわかった。しかし、バイオオーギュメンテーションの効果は初期のラグタイムのみを無くすだけで、以降は活性汚泥のみの場合とそれほど変わらないことがわかった。更に、培養開始10日目で生態バランスを崩してしまうことがわかった。以上より*P. putida*の添加は遺伝子伝達などの危険性は低いものの、培養全期間を通して分解現象そのものには強い効果を示さないことがわかった。

#### 謝辞

実験を行うにあたり、*P. putida* TN1032 (TOL)を提供して頂いた、長岡技術科学大学・生物系の福田雅夫教授に感謝致します。

#### 参考文献

- 1) ウィリアム・アンダーソン編、軽部征夫監修：“バイオレメディエーション”、シュプリンガーフェアラーク社、pp.7-9 (1997)
- 2) 清水達男他：“微生物と環境保全”、三共出版、pp.124-128 (2001)
- 3) 田中孝国他、小山高専紀要第39号、pp.127-130 (2007)
- 4) N.R.KRIEG：“Systematic bacteriology volume 1”、Williams & Wilkins、pp.152、167-168 (1984)
- 5) T.Tanaka、et al.、*Biochem. Eng. J.*、12、pp. 29-36 (2002)
- 6) P.A.Wilderer、et al.、*Water Research*、25、pp.1307-1313 (1991)
- 7) 稲森悠平他、環境技術、30、pp.426-434 (2001)
- 8) A. Fernandez-Astorga、et al.、*Appl. Environ. Microbiol.*、58、pp. 392-398 (1992)
- 9) N. Boon、et al.、*Appl. Environ. Microbiol.*、66、pp.2906-2913 (2000)
- 10) L.N.Liang、et al.、*Appl. Environ. Microbiol.*、44、pp.708-714 (1982)

小山工業高等専門学校 物質工学科

E-mail : tanakatakakuni@oyama-ct.ac.jp

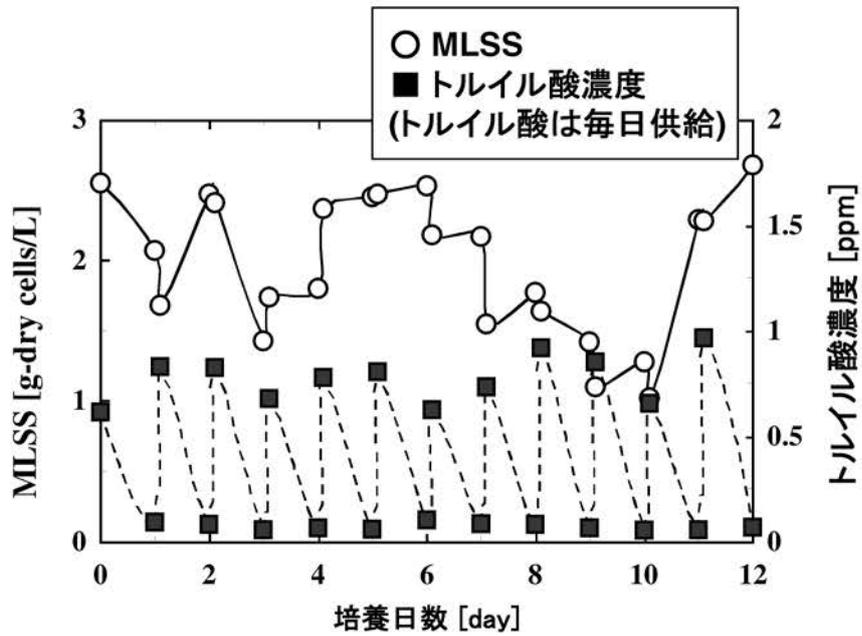


Fig.2 バイオオーギュメンテーションにおける増殖・分解活性

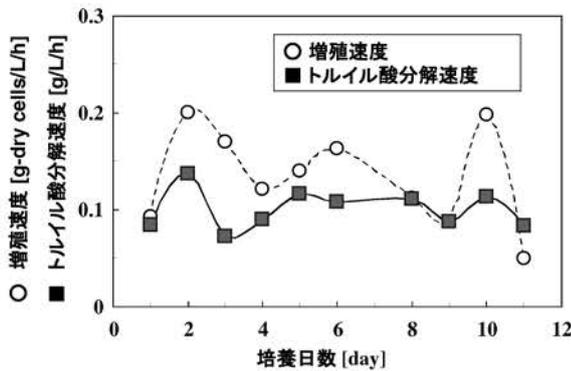


Fig.3 バイオオーギュメンテーションにおける増殖速度とトリプトファン分解速度の経時変化

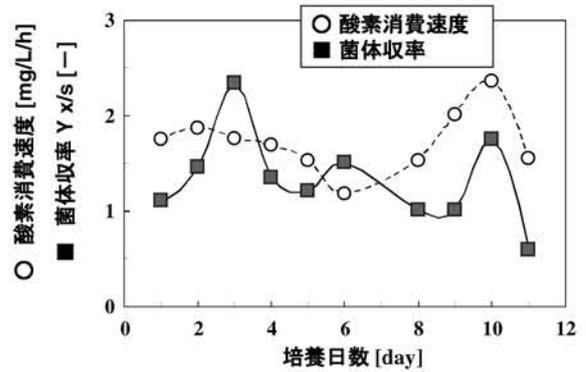


Fig.4 バイオオーギュメンテーションにおける酸素消費速度と菌体収率の経時変化

Table 1 培養日数と培地の違いによる酸素消費速度\*の変化

\* 表中の数値の単位[mg/L/h]

	主炭素源	培養日数 [day]			
		0	2	4	6
模擬廃液	トリプトファン	0.040	0.102	0.072	0.017
活性汚泥用の培地	グルコース	0.028	0.084	0.054	0.028