

〔醸酵工学 第62巻 第1号 15-20, 1984〕

ニトリロ三酢酸に馴養した活性汚泥の性質

柿井 一男・井口 裕・白樫 高史・栗山 光央

宇都宮大学工学部環境化学科

Characteristics of activated sludge acclimatized to nitrilotriacetate. KAZUO KAKII, YUTAKA IGUCHI, TAKASHI SHIRAKASHI, and MITSUO KURIYAMA (*Department of Environmental Chemistry, Faculty of Engineering, Utsunomiya University, Ishii-cho, Utsunomiya 321, Japan*) *Hakkokogaku* 62: 15-20. 1984.

Activated sludge acclimatized to nitrilotriacetate as both a sole carbon and nitrogen source showed good flocculant growth and settling characteristics at various sludge loads. Even at sludge loads from 0.56 to 1.03 kg COD_{cr}/kg MLSS·day, the sludge had good settling properties.

Mucilage obtained by hot water extraction and subsequent ethanol precipitation from the activated sludge consisted of sugars (0.8-1.1%), proteins (0.7-1.0%), DNA (0.6-0.9%), and RNA (0.9-1.2%). This composition did not change significantly with sludge load. Mucilage polysaccharides were hydrolyzed satisfactorily with 0.05 N H₂SO₄ in the presence of Dowex (H⁺ form) at 100°C for 48 h. Sugar components of the mucilage polysaccharide were rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose, galacturonic acid, and glucuronic acid. The major component was glucose (50-60%). The composition of sugars was different from that of mucilage polysaccharides in the activated sludge obtained from municipal sewage treatment plant.

Though the reason for the good flocculant properties of the activated sludge acclimatized to NTA was not clarified, it seems reasonable to assume that the sludge-constituting bacteria are regulated by the sole carbon source, NTA, and remain unaltered even when sludge loads are greatly increased.

活性汚泥法という生物学的水処理法においては、汚泥が沈降性、圧密性にすぐれ、沈殿池での活性汚泥と処理水の分離がうまくなされることがその運転に必要である。活性汚泥のフロック化機構を明らかにするため、異なる活性汚泥から多数のフロック形成菌が分離されている。¹⁻³⁾ これらの結果は、異なる下水および産業排水を処理している活性汚泥のフロック化には異なった種のバクテリアが関与していることを示唆している。

先に報告したように、ニトリロ三酢酸 (NTA) を唯一の炭素源、窒素源として馴養した活性汚泥は沈降性のよいフロックを形成する。⁴⁾ NTAを利用するバクテリアの種類は少ないと予想され、フロックを構成するバクテリア種も単純なものと思われる。そこでこの活性汚泥は、フロック化機構を明らかにする一つのよい実験対象であると思われる。

本報においては、NTA 馴養活性汚泥の基本的な性

質を明らかにするため、いろいろな負荷条件で汚泥を培養し汚泥の性状を調べた。また、活性汚泥からそのフロック化に関与すると思われる粘質物質を抽出し成分の分析をするとともに、多糖の構成糖を調べたので以下に報告する。

実験方法

活性汚泥の培養 下水処理場よりサンプリングした活性汚泥を種汚泥とし、NTA を唯一の炭素源、窒素源として汚泥負荷 (F/M) 0.2 kg NTA/kg MLSS·day の条件で連続培養している活性汚泥⁴⁾ を実験に用いた。負荷条件による汚泥容量指標 (SVI) の変化を見るために、Table 1 に示した培地の NTA 濃度を 200~600 mg/l とし、MLSS を 1.5~2.0 g/l に調整しつつ、汚泥負荷を 0.1~0.4 kg NTA/kg MLSS·day の範囲で段階的に高めた。これらの負荷条件においては NTA は完全に分解され、SVI も 50 前後の値を示

Table 1. Composition of medium.

Nitrilotriacetic acid	400 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	12 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	5 mg
K ₂ SO ₄	6 mg
KH ₂ PO ₄	6 mg
K ₂ HPO ₄	6 mg
Tap water	1 liter

COD_{Cr}: N : P = 100 : 9.7 : 0.81

Medium was adjusted to pH 7.

した。そこでさらに高負荷条件における汚泥性状を検討した。あらかじめ汚泥負荷およそ 0.5 kg NTA/kg MLSS·day で培養した活性汚泥を等容積の二連式の培養槽に移し、負荷をおよそ1.5倍とし、2つを同一条件(初期 MLSS 0.71 g/l)で培養した。各培養槽は Fig. 1 に示したように、曝気部 (11.7 l) および沈殿部 (3.6 l) を有し、全槽内容積は 15.3 l とした。培地は Table 1 に示した組成のものを使用し、曝気量を 3 l/min, 流入水量を 15.3 l/day とし、室温下で培養をおこなった。実験開始初期には12時間毎に、のちには24時間毎に各槽から全汚泥混合液をとり出し、このうちの 1 l を引き抜き、汚泥性状の測定にあてた。なお、8.5日目には一方の槽の汚泥を用いて粘質物質の抽出をおこなった。

汚泥の性状および処理水の分析 汚泥の性状を把握するため以下の測定をおこなった。

1. 活性汚泥沈殿率 (SV₃₀) および濁度 引き抜いた汚泥混合液は汚泥濃度が低いため、いったん15分間静置し上澄を除いたのち 500 ml のメスシリンダーに移し、30分間静置後 SV₃₀ を測定した。また、この上澄の濁度 (OD₆₆₀) を 660 nm の波長で測定し、汚

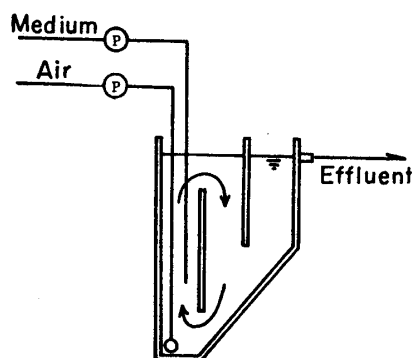


Fig. 1. Schematic diagram of aeration tank.

泥の分散の目安とした。

2. 活性汚泥懸濁物質 (MLSS) および不揮発性懸濁物質 (MLNVSS) 1. で沈降させた汚泥を遠心分離 (10,000 rpm, 10分間) し、ろつばに移し 110°C で一晚乾燥し汚泥乾燥重量を、これを 550°C で一晚灰化し灰化重量を測定した。なお、SV₃₀ および MLSS は曝気部での数値に換算した。

3. 汚泥中の鉄含量 灰化した汚泥を水蒸気浴上で濃塩酸に溶解し、フェナントロリン吸光光度法⁵⁾で定量した。

4. 処理水中の NTA の分析 処理水を 0.45 μm のミリポアフィルターでろ過し、ろ液中の NTA を Zn-Zincon 法⁶⁾で定量した。

粘質物質の抽出 汚泥負荷 0.52kg NTA/kg MLSS·day, および実験開始から8.5日目の汚泥負荷 1.15 kg NTA/kg MLSS·day の汚泥から粘質物質を抽出した。抽出は沸騰水浴中で2時間おこない、その操作の詳細は Fig. 2 に示した。

粘質物質中の成分の分析 粘質物質に含まれる糖の分析にはアントロニー-硫酸法,⁷⁾ カルバゾール-硫酸法⁸⁾を用い、それぞれグルコース、グルクロン酸換算で示した。タンパク質は Lowry らの方法⁹⁾で定量し、ウシ血清アルブミン換算で示した。核酸の定量には、紫外部 (260 nm) 吸収法およびジフェニルアミン-酢酸-硫酸法¹⁰⁾を用い、全核酸、DNA 量を求めた。DNA はタラ精子 DNA·Na 塩に換算して示した。RNA は全核酸と DNA の差より算出した。

多糖の構成糖 粘質物質はカルバゾール-硫酸反応陽性であったため、ウロン酸の存在が予想された。そこで、糖の加水分解条件をウロン酸を含む多糖とし

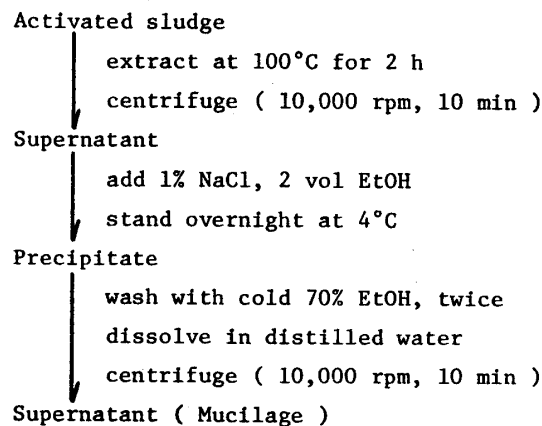


Fig. 2. Extraction of mucilage from activated sludge.

下水活性汚泥から抽出した粘質物質を用いて検討した。なお、加水分解には、 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ で、 100°C 、3時間加水分解する方法、Dowex 50 ($\times 2$, H^+ 型) の存在下 $0.05\text{N H}_2\text{SO}_4$ で 100°C 、24 および 72 時間加水分解する方法を試みた。加水分解後、 BaCO_3 で中和、脱塩したのち、Dowex 1 ($\times 4$, OAc^- 型) を用いて糖の分画をおこなった。中性糖は糖アルコールに還元したのちアセチル化する Sawardeker らの方法¹¹⁾、酸性糖はアルドン酸に還元後トリメチルシリル化する Perry & Hulyalkar の方法¹²⁾ に従い、ガスクロマトグラフィーにより糖組成を求めた。

実験結果

活性汚泥の特性 実験は A, B 二連式の培養槽を用い、同条件下でおこなったため A 槽についての実験結果を以下に示した。SV₃₀, MLSS, および SVI の経時変化を Fig. 3 に、汚泥負荷、曝気槽の水温、30分間静置後の上澄の濁度 (OD₆₆₀)、および処理水中の NTA 濃度の経時変化を Fig. 4 に示した。実験開始から 3 日目までは処理水中に未分解の NTA が検出されたが、3.5 日目になると高負荷条件に慣れ NTA は完全に処理された。しかし 8.5 日目から未分解の NTA が増加していった。これは、実験を室温下でおこなったため、Fig. 4 に示したように水温が下がり、菌体活性が低下したためと思われる。この間、汚泥混合液を 30 分間静置した上澄の濁度は常に 0.01 以下であり、汚泥の凝集性、沈降性は非常にすぐれていた。汚泥中の灰分含量および鉄含量を調べた結果を Fig. 5 に示した。汚泥乾燥重量あたりの灰分含量は初期 13% であったが、のちには 8~9% の範囲でほぼ一定していたのに対し、鉄含量は 1.5% から 0.5% へと大きく減少した。汚泥中の鉄含量が減少する期間は処理水中に NTA が検出された期間とよく対応しており、未分解の NTA による鉄の溶出が考えられた。

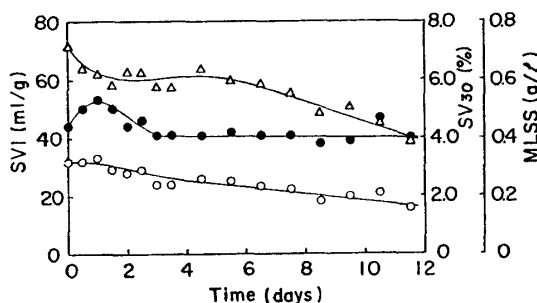


Fig. 3. Variations in SV₃₀, MLSS, and SVI. Symbols: ○, SV₃₀; △, MLSS; ●, SVI.

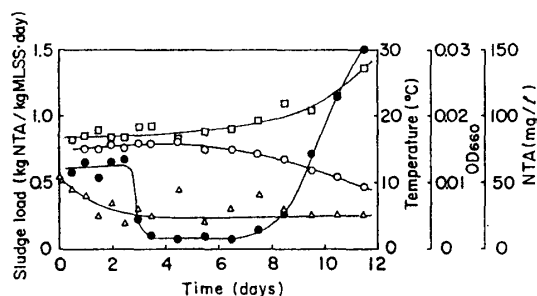


Fig. 4. Variations in sludge load, temperature, turbidity, and NTA concentration in effluent. Symbols: □, sludge load; ○, temperature in aeration tank; △, OD₆₆₀; ●, NTA concentration in effluent.

粘質物質の成分組成 抽出に用いた活性汚泥の性状と抽出された粘質物質の分析結果を Table 2 に示した。また、この連続実験以外の別の時期におこなった分析結果も合わせて示した。汚泥負荷を 0.52 から 1.15 kg NTA/kg MLSS·day に高めたことにより、タンパク質と核酸の抽出量が増加し、なかでも RNA の増加が顕著であった。多糖は負荷の変化によらず 1.1% 抽出された。しかし他のデータと比較しても明らかのように、粘質物質は活性汚泥からはほぼ一定の割合で抽出され、培養条件により大きく左右されなかった。多糖は 0.8~1.1%，タンパク質は 0.7~1.0%，DNA は 0.6~0.9%，RNA は 0.9~1.2% 活性汚泥から抽出された。

多糖の加水分解条件の検討 ウロン酸を含む多糖の加水分解条件の検討を、下水活性汚泥から抽出した粘質物質を用いておこなった。 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ で加水分解する方法と、 $0.05\text{N H}_2\text{SO}_4$ (Dowex 50, H^+ 型共存下) で加水分解する方法から求めた中性糖の組成には、若干の差があった。しかし、 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ で加水分解した場合ウロン酸はガスクロマトグラフで検出できなかった。

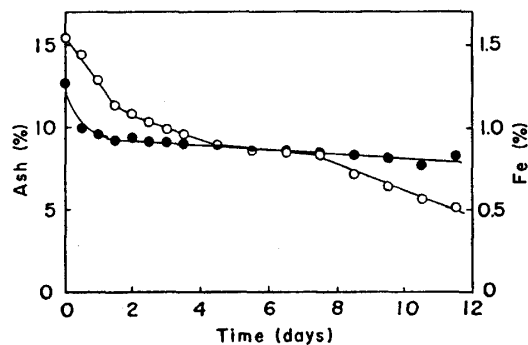


Fig. 5. Variations in ash and iron contents in the activated sludge. Symbols: ●, Ash; ○, Fe.

Table 2. Characteristics of activated sludge acclimatized to NTA and its mucilage components.

	1980.1.14	1982.9.29	F/M [‡] 0.52	F/M 1.15
SV ₃₀ (%)	15.8	17.0	4.0	1.97
MLSS (g/l)	2.65	2.58	0.773	0.457
SVI (ml/g)	59.6	65.9	51.7	43.0
Sugar* (%)	0.83	0.98	1.14	1.09
Protein** (%)	0.84	0.97	0.69	0.84
DNA*** (%)	0.76	0.60	0.61	0.88
RNA (%)	0.88	0.92	0.31	1.22

* glucose equivalent

** Bovine serum albumin equivalent

*** Cod sperm DNA-Na equivalent

[‡] F/M, sludge load, kg NTA/kg MLSS·day

った。このため、加水分解は 0.05N H₂SO₄ (Dowex 50, H⁺ 型共存下) を用いておこなった。その分析結果を、グルコースに対するモル比として Table 3 に示した。加水分解時間の延長により、キシロース、マンノース、ガラクトン酸量に違いが見られたが、他の糖はほとんど影響されず変化しなかった。これらの結果から、酸加水分解時間を48時間と決定した。

NTA 馴養活性汚泥から抽出した多糖の構成糖先の条件で加水分解した多糖から得られた中性糖、酸性糖のガスクロマトグラムを Fig. 6 および 7 に示した。中性糖としては主にラムノース、リボース、マンノース、ガラクトース、グルコースが、酸性糖としてはガラクトン酸、グルクロン酸が検出された。Table 4 には多糖の構成糖をグルコースに対するモル比とし

Table 3. Molar ratio of sugars in mucilage polysaccharide extracted from sewage activated sludge.

Components	Time of hydrolysis	
	24 h	72 h
Rhamnose	0.76	0.71
Fucose	0.49	0.52
Ribose	0.69	0.69
Arabinose	0.44	0.40
Xylose	0.27	0.20
Mannose	0.79	1.00
Galactose	1.10	1.00
Glucose	1.00	1.00
Galacturonic acid	0.26	0.19
Glucuronic acid	0.26	0.26

expressed as molar ratio to glucose.

て示した。多くのリボースが検出されたため、粘質物質を 0.3 N KOH のアルカリ条件下、30°C で16時間処理し、アルコールを添加して多糖を沈殿回収したのち、構成糖の検討をおこなった結果、リボースは完全に消失した。このことから、ここに測定されたリボースは多糖の構成成分として存在するものではなく、RNA に由来することが確認された。NTA 馴養活性汚泥から抽出された多糖は Table 4 から明らかのように、主にラムノース、マンノース、ガラクトース、グルコース、グルクロン酸からなり、その50~60%がグルコースであったことが大きな特徴であった。またこれらの構成糖は負荷条件によらず似通った組成であった。

考 察

一般に、標準活性汚泥法においては BOD 負荷を

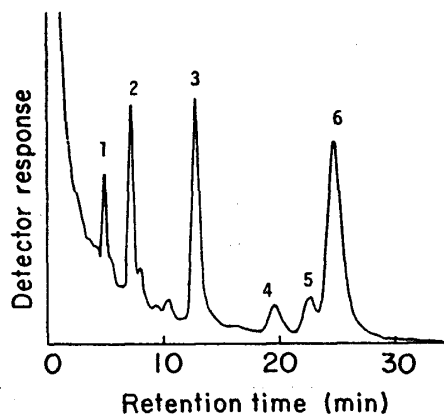


Fig. 6. Gas chromatogram of the neutral sugars in mucilage polysaccharide. 1, rhamnose; 2, ribose; 3, 2-deoxy-D-glucose (internal standard); 4, mannose; 5, galactose; 6, glucose.

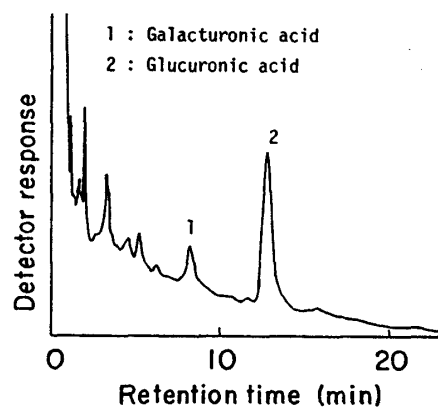


Fig. 7. Gas chromatogram of the acidic sugars in mucilage polysaccharide.

Table 4. Molar ratio of sugars in mucilage polysaccharide extracted from activated sludge acclimatized to NTA.

Components	F/M [*] 0.52	F/M 1.15	1981.12.4.
Rhamnose	0.10	0.10	0.11
Fucose	0.05	0.05	0.02
Ribose	0.18	0.43	0.32
Arabinose	0.08	0.09	0.06
Xylose	0.06	0.05	0.03
Mannose	0.20	0.16	0.12
Galactose	0.13	0.23	0.17
Glucose	1.00	1.00	1.00
Galacturonic acid	0.02	0.03	0.03
Glucuronic acid	0.12	0.13	0.15

^{*} F/M kg NTA/kg MLSS-day
expressed as molar ratio to glucose.

0.2~0.4 kg BOD/kg MLSS-day として運転することが望ましいと言われ、負荷が0.2以下の条件では汚泥を構成する菌体細胞中のタンパク質や RNA が内生呼吸により分解され、軽く沈降性の悪い分散した汚泥となり、一方負荷が0.4以上の条件下では *Sphaerotilus* で代表される糸状細菌が優占種となり、バルキング状の沈降しにくい汚泥になると言われている。

NTA を唯一の炭素源、窒素源として馴養した活性汚泥は、汚泥負荷 0.1~1.36 kg NTA/kg MLSS-day、理論的な COD_{Cr} 負荷として 0.075~1.03 kg COD_{Cr}/kg MLSS-day という幅広い負荷条件においても SVI は50前後に保たれ、汚泥の凝集性、沈降性ともにすぐれていた。清水ら¹³⁾ はグルコースおよび尿素からなる合成下水を用いて、COD_{Cr} と窒素とリンのバランスと糸状性バクテリアの増殖の関係を詳しく研究し、COD_{Cr}:N:P=100:10:1 と COD_{Cr} に対し N と P が充分に供給されると 1.0 kg COD_{Cr}/kg MLSS-day 以下の負荷条件においては糸状性バクテリアの増殖をおさえ、沈降性のすぐれた活性汚泥を維持できることを報告している。NTA を唯一の炭素源、窒素源とした培地においては COD_{Cr}:N=100:9.7 であり、リンの供給を充分におこなうと清水らのいう糸状性バクテリアの増殖をおさえる栄養バランスの条件を満たすことが可能である。今回用いた培地の栄養バランスは COD_{Cr}:N:P=100:9.7:0.81 であった。

活性汚泥中の不揮発性成分である灰分含量は汚泥の比重と密接に関係し、灰分含量の高い汚泥は比重も高く沈降性にすぐれるものと思われる。一般に、下水を

処理している活性汚泥の灰分含量は20~35%と高いが、SVI は100~200である。NTA 馴養活性汚泥の場合には本実験期間中8~9%という低い灰分含量であったにもかかわらず、SVI は40~50という小さな値であった。このことより、沈降性、圧密性などの汚泥の特性は汚泥中の灰分含量以外の他の因子により大きく左右されるものと思われた。

活性汚泥のフロック化現象を説明するため、現在までに諸説が提出されており、粘質物質説が広く認められているが、粘質物質は汚泥のフロック化ばかりでなく、汚泥の物性と大きく関わっていることが指摘されている。Pavoni ら¹⁴⁾ は、活性汚泥から高速遠心により粘質物質を抽出し、これらが多糖、タンパク質、RNA、および DNA からなり、フロックの形成はこれら細胞外高分子の生産と関連することを報告している。小田ら¹⁵⁾ は活性汚泥からアルカリ抽出物質を調製し、pH を段階的に変化させることにより抽出物質を分画したところ、pH 3 で沈殿するフラクションが最も多いことから、このフラクションが SV₃₀ に大きく影響するものと推察した。NTA 馴養活性汚泥から抽出された粘質物質はほぼ同量の多糖、タンパク質、DNA、および RNA からなり、培養条件によらず3~4%の収率で得られた。本実験からは NTA 馴養活性汚泥のすぐれた特性と粘質物質との関連は得られなかった。

下水活性汚泥から抽出した粘質物質を用い、多糖の加水分解条件を検討した。2 N H₂SO₄ を用いて加水分解した場合、ウロン酸はガスクロマトグラフで検出されなかったが、この原因は明らかではない。Dowex 50W と0.05 N H₂SO₄ で加水分解した場合、中性糖、酸性糖ともに満足のいく結果が得られた。下水活性汚泥粘質物質中の多糖はヘキソースを主とし、メチルペントース、ペントース、ウロン酸の各種の糖により構成されるのに対し、NTA 馴養活性汚泥から抽出された多糖は、主にラムノース、マンノース、ガラクトース、グルコース、グルクロン酸からなり、その50~60%がグルコースであり、糖組成にかたよりのあることが特徴であった。

滝口¹⁶⁾ は正常およびバルキング状態の汚泥から粘質物質を抽出し、多糖の構成糖を調べている。バルキング汚泥から得られた多糖はグルコース(33%)、マンノース(33%)、アラビノース(12%)、デオキシリボース(2%)からなり、正常な汚泥から抽出された多糖との間に違いが見られなかった。しかし、バルキング汚泥にはグルコン酸が存在していたことを報告して

いる。また, Wallen & Davis¹⁷⁾ は下水活性汚泥から, グルコース (41%), マンノース (13%), ラムノース (20%) 他からなる多糖を抽出した。Sato & Ose¹⁸⁾ はペプトンを用いた合成下水の活性汚泥から抽出した多糖はアラビノース, マンノース, ガラクトース, グルコース, アミノ糖と他の二, 三の糖からなることを報告している。このように種々の活性汚泥から抽出される多糖は, いずれも異なった組成をもつヘテロ多糖であった。下水および産業排水を処理している活性汚泥は, 栄養バランス, 汚泥負荷, 水質など, 多様な条件下におかれているため, それぞれの環境に適応した微生物相がつくられているものと思われる。NTA を唯一の炭素源, 窒素源として馴養した活性汚泥は負荷条件によらず, グルコースを主とした多糖を生産し, その構成糖も安定していることから, この NTA 馴養活性汚泥を構成するバクテリア相は比較的安定に保たれているものと推定された。

要 約

NTA を唯一の有機性基質とし, 幅広い負荷条件下で汚泥を培養して汚泥の性状を調べるとともに, 活性汚泥から粘質物質を抽出し, その組成の変化を分析した。また粘質物質中の多糖の構成糖を調べ, 次の結果を得た。

1. NTA を唯一の基質として活性汚泥を 0.075~1.03 kg COD_{Cr}/kg MLSS·day という負荷条件で培養したが, 汚泥の凝集性, 沈降性にすぐれ, SVI は 50 前後の値であった。
2. NTA 馴養活性汚泥から粘質物質はその培養条件によらず, はぼ一定の割合で抽出された。その成分は多糖(0.8~1.1%), タンパク質(0.7~1.0%), DNA (0.6~0.9%), RNA (0.9~1.2%) であった。
3. 粘質物質中の多糖の酸加水分解は Dowex 50W (H⁺ 型) の存在下, 0.05 N H₂SO₄ 中で 100°C, 48 時間おこなうことにより, 中性糖と酸性糖の分析に満足のいく結果を得た。
4. NTA 馴養活性汚泥から抽出された多糖は, ラムノース, マンノース, ガラクトース, グルコース, グルクロン酸を主な構成糖とし, その50~60%はグルコースであった。この糖組成は, 種汚泥として用いた

下水活性汚泥から抽出した多糖の組成とは明らかに異なっていた。下水活性汚泥の多糖は, ヘキソースを主とし, メチルペントース, ペントース, ウロン酸の各種の糖からなっていた。

以上, この NTA 馴養活性汚泥は NTA を唯一の基質として培養しているため, 汚泥を構成するバクテリア相に大きな変化がなく, 粘質物質の成分および多糖の構成糖が一定に保たれ, 沈降性, 圧密性にすぐれた汚泥の特徴を有するものと推定した。

文 献

- 1) Kiuchi, K., Kuraishi, H., Murooka, H., Aida, K., Uemura, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **14**, 387 (1968).
- 2) Kato, A., Izaki, K., Takahashi, H.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 439 (1971).
- 3) Ueda, S., Earle, R. L.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 239 (1972).
- 4) 栗山, 柿井, 白樫: 醸酵工学, **61**, 341 (1983).
- 5) JIS K 0102-1981, p. 166.
- 6) Thompson, J. E., Duthrie, J. R.: *J. Water Pollut. Control Fed.*, **40**, 306 (1968).
- 7) 阿武, 瀬野: 糖質実験法 (蛋白質・核酸・酵素別冊), p. 13, 共立出版 (1968).
- 8) Bitter, T., Muir, H. M.: *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).
- 9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 10) Burton, K.: *Biochem. J.*, **62**, 315 (1956).
- 11) Sawardeker, J. S., Sloneker, J. H., Jeanes, A. R.: *Anal. Chem.*, **37**, 1602 (1965).
- 12) Perry, M. B., Hulyalkar, R. K.: *Can. J. Biochem.*, **43**, 573 (1965).
- 13) Shimizu, T., Wakimura, K., Tanemura, K., Ichikawa, K.: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 275 (1980).
- 14) Pavoni, J. L., Tenney, M. W., Echelberger, W. E. Jr.: *J. Water Pollut. Control Fed.*, **44**, 414 (1972).
- 15) 小田, 神辺, 土屋, 藤尾: 醸酵工学, **59**, 125 (1981).
- 16) 滝口: 醸工, **50**, 331 (1972).
- 17) Wallen, L. L., Davis, E. N.: *Environ. Sci. Technol.*, **6**, 161 (1972).
- 18) Sato, T., Ose, Y.: *Water Res.*, **14**, 333 (1980).

(昭58. 9. 5受付)