

〔醸酵工学 第63巻 第4号 297-301. 1985〕

## 生物膜および活性汚泥より分離した優勢細菌の COD 除去に及ぼす相乗作用\*

吉原 一年・上田誠之助\*\*

工業技術院四国工業技術試験所, \*\*九州大学農学部食糧化学工学科

\*Cooperative action of COD removal activity of dominant bacteria isolated from biofilm and activated sludge. KAZUTOSHI YOSHIHARA and SEINOSUKE UEDA (Government Industrial Research Institute Shikoku, 2-3-3, Hananomiya-cho, Takamatsu, Kagawa 761, Japan; \*\*Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan) Hakkokogaku 63: 297-301. 1985.

Cooperative actions of dominant bacteria (*Pseudomonas* sp. U52, *Vibrio* sp. A6, *Flavobacterium* sp. S78 and unidentified strain S102c) isolated from a biofilm, an activated sludge, and an acclimated sludge were investigated by measuring the COD removal activity (Abbreviated as CODr) against a synthetic waste water composed of glucose, Polypepton and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (each 1000 mg/l; hereafter abbreviated as GPK-1000).

With the mixed culture consisting of two strains, CODr increased to 1.2 to 1.5 times in comparison with the single strain. In the case of the mixed culture consisting of three strains, two to three-fold CODr was recognized. The more the members of the culture were, the more cooperative actions were recognized. The CODr of the mixed culture consisting of three strains increased about 4-fold in comparison with the acclimated sludge.

活性汚泥や生物膜は、種々のマイクロフローラ、マクロファウナより構成されている。<sup>1,2)</sup> これら生態系を構成する生物群は、協同的もしくは、相乗的に対象廃水に対して作用し、廃水中に含まれる有機物を、最も有効に除去しているものと推察される。Ueda と Earle は,<sup>3)</sup> 汚泥を構成する優勢細菌を分離し、これらをさらに再構成して、フロック形成能のすぐれた、かつまた、有機物除去能もすぐれた汚泥を調製した。本実験では、グルコース、リン酸第1カリウム、ポリペプトンよりなる合成廃水に馴養した汚泥あるいは、本合成廃水を処理する充てん塔式ろ床中の生物膜あるいは都市下水を処理する活性汚泥より分離した優勢細菌の数種について、それらの COD 除去の際の相乗効果について検討したので報告する。

### 実験方法

合成廃水    グルコース、リン酸第1カリウム、ポ

\* 充てん塔式ろ床法による有機性廃水の処理(第8報)  
Treatment of Organic Waste Water by Tower-Type  
Packed Biofilter (VIII)

リペプトンをそれぞれ等量ずつ水道水に溶かしたものを合成廃水として使用した。なお、以後は、このものを GPK と略す。例えば、各 1,000 mg/l ずつ溶かしたものは、GPK-1000 と略記する。<sup>4)</sup>

なお、 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  法 (JIS K0102-1971) により測定した GPK-1000 の COD 値は約1950であった。

供試菌株    本実験で供試した菌株は、U 52, A 6, S 78, S 102c の4菌株であった。

U 52 は、Ueda と Earle がニュージーランドの都市下水処理の活性汚泥より分離したもので *Pseudomonas* sp. であった。<sup>3)</sup> A 6 は、本実験で使用した合成廃水を処理する充てん塔式ろ床の生物膜より分離した優勢細菌の一つで、*Vibrio* sp. であった。<sup>5)</sup> S 78 と S 102c とは、いずれも本合成廃水の馴養汚泥より分離した菌株で、<sup>6)</sup> S 78 は *Flavobacterium* sp., S 102c は未同定菌であった。

供試菌株はいずれも普通寒天培地<sup>7)</sup> に1か月ごとに植え継ぎ、5°C で保存した。

COD 除去速度の測定法    各供試菌株を、500 ml

容三角フラスコに 100 ml 分注した GPK-5000 で 25 °C にて, 24時間回転振とう培養し, 振幅 70 mm, 回転数 160 rpm にて菌体を増殖せしめた. このものを 8,000 rpm, 10分間遠心分離して菌体を回収した. さらに同量の 0.85% NaCl で 3 回同様に遠心分離し, 洗浄を繰り返し, このものを単菌レベルにおける供試菌体とした.

COD 除去速度は, 500 ml 三角フラスコに GPK-1000 を 60 ml 分注し, このものに各供試菌体を, 単菌レベルの場合菌体湿重量が約 1% となるよう, また, 混合レベルでは, 構成する各菌体の湿重量比を種々変化させて混合せしめた. この際, 各菌体を混合した後の合成廃水中の菌体の総湿重量が約 1% になるよう調製した. 例えば, A6 と U52 とよりなる 2 菌混合系の場合,  $A6/(A6+U52)$  と記し, この値すなわち混合比 (mixed ratio) が 0.6 というのは  $0.6/(0.6+0.4)$  を示し, A6 の湿重量が 0.6 g, U52 の湿重量が 0.4 gであることを示している. さらに, 例えば A6, U52, S102c からなる 3 菌混合系の場合,  $A6/(A6+U52, S102c)$  などと記し, これは混合比が 0.6 の時は, U52 と S102c の湿重量が各々等量, すなわち, この場合 0.2 g ずつと A6 の湿重量が 0.6 g であることを示している. また同じ 3 菌混合系の場合でも,  $U52/(U52+A6, S102c)$  の混合比が 0.6 というのは, A6 と S102c の湿重量が各々等量すなわちこの場合, 0.2 g ずつと U52 の湿重量が 0.6 g であることを示している. 以後の COD 除去速度を測定する具体的方法は前報に従って行った.<sup>8)</sup>

**複数菌混合系における CODr に及ぼす効果の表示法ならびに解釈** 複数の微生物群の混合培養時における CODr に及ぼす効果については, Fig. 1 に示したように四つの場合が考えられる. すなわち, 実線は相乗効果も阻害効果も認められない場合, 破線は全ての混合比 (mixed ratio) にわたって相乗効果が認められる場合, 1 点鎖線は, ある混合比では阻害効果が, また, ある混合比では相乗効果が認められる場合, 2 点鎖線は, 全ての混合比にわたって阻害効果が認められる場合である. これを 2 菌混合系, 例えば A と B についてみてみると, 相乗効果も阻害効果も認められない場合, その CODr の理論値は実線をたどる. しかし, 例えば, 破線のような結果が得られた場合は混合比 0.6 すなわち  $A/(A+B)=0.6$  (A が 0.6 g で B が 0.4 g の場合) に CODr 極大値 92 が得られ, この混合比の時の実線 CODr 値 68 より, 最大相乗効果は  $92/68$

$=1.35$  倍と結論できる. さらに混合比 0.6 であるから, B の方が相乗効果により寄与しているものと推定できる. また, 1 点鎖線のデータが得られた場合, 混合比が 0.3 の時  $(0.3/(0.3+0.7))$  CODr 極小値 25 が得られ, この混合比の時の実線 CODr 値 59 とより  $59/25=2.36$  倍の最大阻害効果が, また, 混合比 0.7  $(0.7/(0.7+0.3))$  の時の CODr 極大値 85 とこの混合比の時の実線の CODr 値 70 とより  $85/70=1.21$  倍の最大相乗効果があるものと結論できる. 全ての混合比にわたって 2 点鎖線のような結果が得られたならば, これは全ての混合比にわたって阻害効果が認められたことになる. この場合, CODr 極小値は, 混合比 0.3 の時 25 であるから, この混合比の時の実線の CODr 値 59 とより,  $59/25=2.36$  倍の最大阻害効果が認められるものと結論できる. さらに混合比が 0.3 の時であるから, この阻害効果に寄与しているのは, A の方が大であると推定される.

同様の考察は, 3 菌混合系以上の複数混合系の場合についても応用できる. 例えば, C, D, E よりなる 3 菌混合系の場合は,  $C/(C+D, E)$ ,  $D/(D+C, E)$ ,  $E/(E+C, D)$  の三つの系について実験を行えば良い. この場合, 例えば  $C/(C+D, E)$  の系では, D と E の菌体量を同量とする. すなわち, 混合比が 0.2 というのは

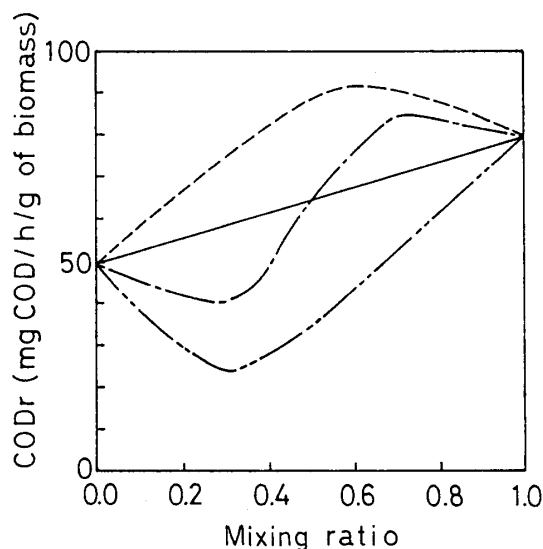


Fig. 1. Interpretation of the mixed culture consisted of plural microorganisms on CODr.

Legend: —, CODr curve with neither cooperative nor inhibitory action of mixed culture; ---, CODr with both cooperative and inhibitory action of mixed culture; ·····, CODr curve with inhibitory action of mixed culture; - · - · - ·, CODr curve with cooperative action of mixed culture.

$C=0.2$  g,  $D=0.4$  g,  $E=0.4$  g とすれば良く, さらに混合比が0.6というのは  $C=0.6$  g,  $D=0.2$  g,  $E=0.2$  g としてそれらの CODr 値を求めれば良い. 3菌混合系の場合の CODr に及ぼす相乗効果, 阻害効果についての解釈の方法は, 2菌混合系の場合と全く同様にしてなされ, 最大相乗効果, 最大阻害効果の計算方法も, 2菌混合系の場合に全く準拠して行い, 解釈することができる. ただ, いずれの菌が相乗効果なり阻害効果に大きく寄与しているかは, 三つの実験系の結果より総合的に結論する必要がある.

以下, 3菌以上の複数菌混合系の場合についても同様の手法が適用できるが, 本報告では2菌混合系ならびに3菌混合系の場合についてのみ報告する.

### 実験結果と考察

**単菌レベルでの供試菌体の特性** 単菌レベルでの各供試菌体の特性を Table 1 に示した. Table 1 には, S78 と S102c の分離起源である馴養汚泥の, さらには, その種菌となった家庭排水を処理する活性汚泥の特性値についても併記した. S102c は, 馴養汚泥のフロックを生じせしめる主要菌株であった. A6 と S78 は, 充てん塔式ろ床の種菌として使用されたが,<sup>5,6,9)</sup> いずれもフロック形成能を有するが, 上澄部は, 若干濁った.

比増殖速度は, U52 が最も大きな値 ( $0.160\text{ h}^{-1}$ ) を示したが, 馴養汚泥のそれ ( $0.240\text{ h}^{-1}$ ) には及ばな

Table 1. Characteristics of dominant bacteria and sludges.

| Strain & sludge   | Floc <sup>1</sup> formation | $K_1$ <sup>2</sup> ( $\text{h}^{-1}$ ) | CODr <sup>4</sup> mgCOD/h·g of biomass |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| U52               | —                           | 0.160                                  | 180                                    |
| A6                | +                           | 0.062                                  | 153                                    |
| S78               | ++                          | 0.138                                  | 461                                    |
| S102c             | +++                         | 0.060                                  | 163                                    |
| D.S. <sup>5</sup> | +++                         | n. d. <sup>3</sup>                     | 13                                     |
| A.S. <sup>6</sup> | +++                         | 0.240                                  | 172                                    |

<sup>1</sup> Signs mean; —, non-flocculated; +, slightly flocculated; ++, moderately flocculated; +++, clearly flocculated.

<sup>2</sup> specific growth rate.

<sup>3</sup> not determined.

<sup>4</sup> COD removal activity against GPK-1000.

<sup>5</sup> Domestic sludge acclimated to the synthetic wastewater (GPK-1000) for one month by the fill and draw cultivation method.

<sup>6</sup> Original domestic sludge.

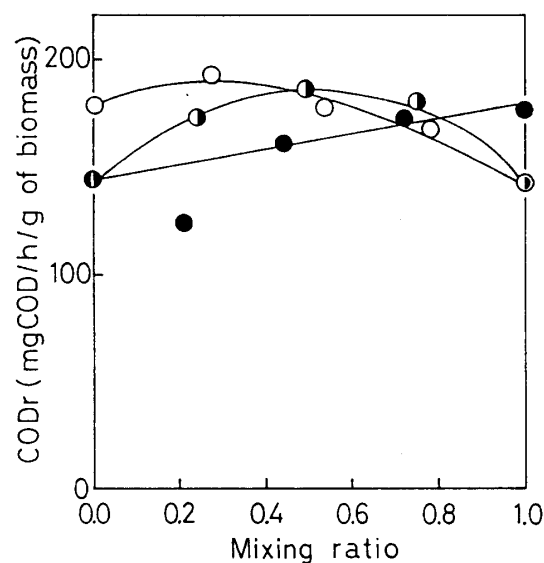


Fig. 2. Cooperative action of two-mixed culture. Legend: ○, A6/(A6+U52); ◐, A6/(A6+S102c); ●, U52/(U52+S102c).

った. *Escherichia coli* や *Aerobacter aerogenes* の場合は, 約  $2.400\text{ h}^{-1}$  であり,<sup>10)</sup> 活性汚泥より分離した細菌は, これらに比するとはるかに小さい増殖速度しか有していないことが明らかになった.

CODr は S78 が最も大きく ( $461\text{ mg/h}\cdot\text{g}$  of bio-

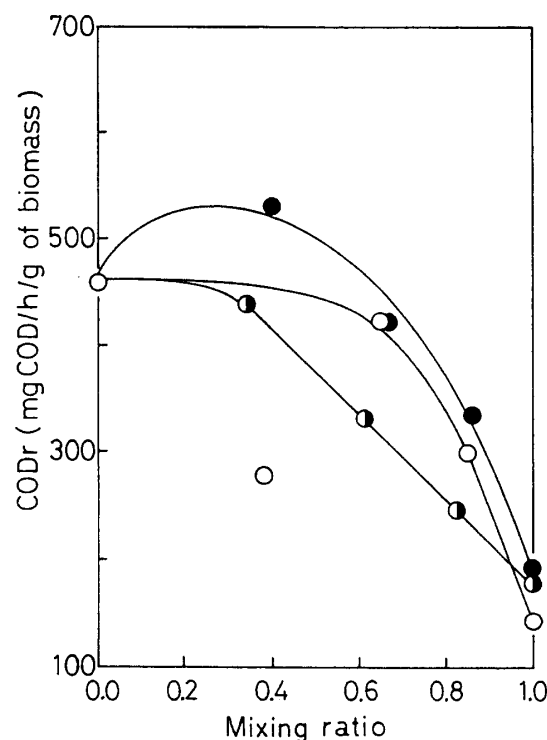


Fig. 3. Cooperative action of two-mixed culture. Legend: ○, A6/(A6+S78); ◐, U52/(U52+S78); ●, S102c/(S102c+S78).

mass), 分離源である馴養汚泥のそれ (172 mg/h·g of biomass) より 3 倍弱の活性を有していた。残りの U52, A6, S102c の 3 株は, 馴養汚泥とほぼ同等の活性を有していた。

**混合レベルでの COD 除去特性** 2 菌レベルでの COD 除去特性を, Fig. 2, Fig. 3 に示した。A6 と U52 との混合レベルでは, わずかに相乗効果が認められた (Fig. 2)。A6 と S102c との混合レベル (Fig. 2) S102c 株と S78 との混合レベル (Fig. 3) では, 明瞭な相乗効果が認められた。U52 と S102c との混合レベル (Fig. 2), A6 と S78 との混合レベル (Fig. 3), U52 と S78 との混合レベル (Fig. 3) では, 若干の相乗効果が認められた。相乗効果の認められる系では, いずれも 1.2~1.5 倍の CODr の増加が認められた。

3 菌レベルでの COD 除去特性を, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 に示す。これらの図より明かなように (S78, A6, U52) の混合レベルの場合を除いては, いずれの場合も, 2~3 倍程度の CODr の増加が認められた。

本実験で使用した合成廃水成分のうち, COD を構成するものは, グルコースとポリペプトンである。ポリペプトンは, 種々のポリペプチド, ジペプチドおよ

びアミノ酸を含む混合物であり,<sup>11)</sup> 菌株によって資化する成分が異なるものと推定される。事実, 充てん塔式ろ床の生物膜より分離された優勢バクテリアの基質除去特性は大いに異なる。<sup>8)</sup> また, Gaudy ら<sup>12-14)</sup> は, heterogeneous な混合微生物系で, biphasic, triphasic な基質除去特性について報告している。一般に, 混合基質を含む廃水の場合, それらを除去するマイクロフローラやマクロファウナは, 全ての成分の除去能力が最大となるように構成されるものと推察される。<sup>8)</sup> 従って, 混合レベルの構成菌株が多くなるほど CODr は増加することになる。<sup>3)</sup> 3 菌系の場合, CODr は約 600 mg COD/h·g of biomass にも達し, 馴養汚泥の 172 mg COD/h·g of biomass に比べると, 4 倍弱の活性の増加が認められた。

## 要 約

活性汚泥より分離した細菌 (*Pseudomonas* sp. U52, *Vibrio* sp. A6, *Flavobacterium* sp. S78, S102c) の COD 除去活性の相乗効果について検討した。2 菌混合系の場合には, 単菌レベルの場合に比べると約 1.2~1.5 倍 COD 除去活性が向上した。また, 3 菌系の場合には, COD 除去の相乗効果は約 2~3 倍となり, 構

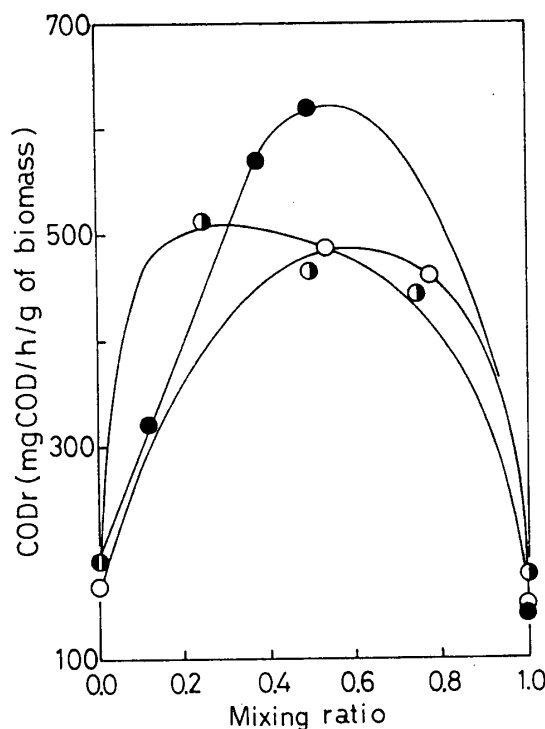


Fig. 4. Cooperative action of three-mixed culture. Legend: ○, A6/(A6+U52, S102c); ◐, U52/(U52+A6, S102c); ●, S102c/(S102c+A6, U52).

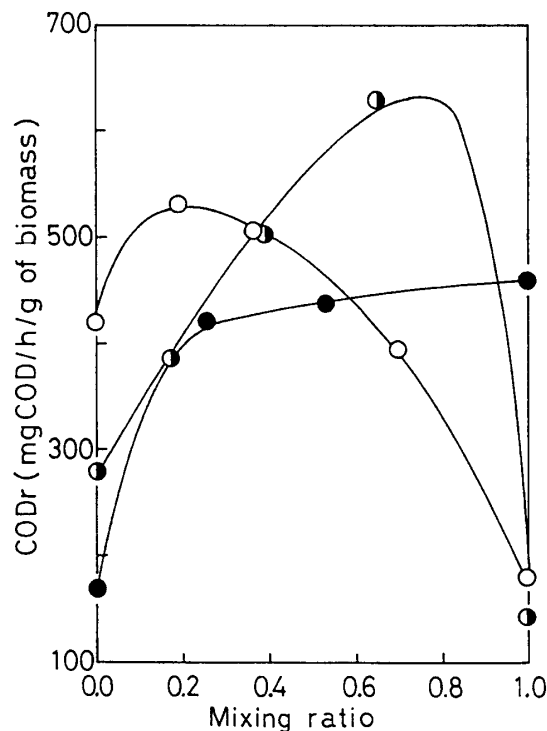


Fig. 5. Cooperative action of three-mixed culture. Legend: ○, U52/(U52+S78, S102c); ◐, S102c/(S102c+U52, S78); ●, S78/(S78+U52, S102c).

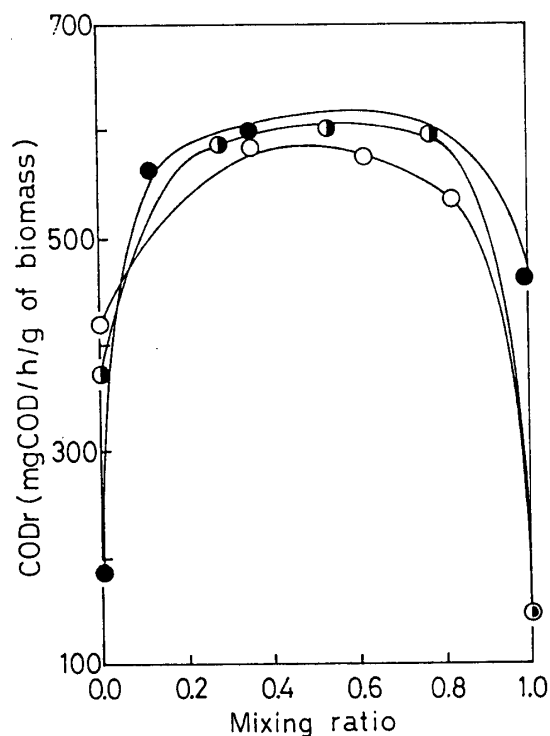


Fig. 6. Cooperative action of three-mixed culture.  
Legend: ○, A6/(A6+S78, S102c); ◐, S102c/(S102c+A6, S78); ●, S78/(S78+A6, S102c).

成菌株数が多くなるほど大きな相乗効果が得られることが明らかとなった。

また、分離源となった原活性汚泥に比べ、約4倍弱のCOD除去活性の増加が認められた。

#### 文 献

- 1) Metcalf & Eddy, Inc.: *Wastewater Engineering*, 1st Ed., McGraw-Hill, New York (1972).
- 2) 上田誠之助, 吉原一年: *New Food Industry*, 19, 6 (1977).
- 3) Ueda, S., Earle, R.L.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18, 239 (1972).
- 4) 吉原一年, 宇都生大, 三分一政男, 藤尾雄策, 上田誠之助: *醸酵工学*, 55, 122 (1977).
- 5) 吉原一年, 三分一政男, 藤尾雄策, 上田誠之助:

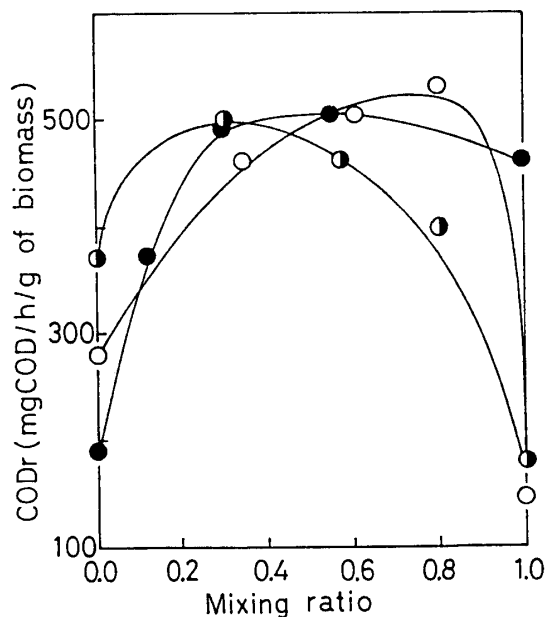


Fig. 7. Cooperative action of three-mixed culture.  
Legend: ○, A6/(A6+U52, S78); ◐, U52/(U52+A6, S78); ●, S78/(S78+A6, U52).

醸酵工学, 55, 129 (1977).

- 6) 吉原一年, 大久保哲朗, 藤尾雄策, 上田誠之助: *醸酵工学*, 57, 475 (1979).
- 7) 微生物研究法懇談会編: *微生物学実験法*, 421, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1977).
- 8) 吉原一年, 箴島克裕, 藤尾雄策, 上田誠之助: *醸酵工学*, 58, 187 (1980).
- 9) 吉原一年, 箴島克裕, 藤尾雄策, 上田誠之助: *醸酵工学*, 58, 131 (1980).
- 10) Buswell, A. M., Meter, I. V., Gerke, I. R.: *Sewage and Ind. Wastes*, 22, 508 (1950).
- 11) 坂崎利一: *新細菌培地学講座*, 125, 近代出版, 東京 (1978).
- 12) Gaudy, A. F. Jr.: *Appl. Microbiol.*, 10, 264 (1962).
- 13) Gaudy, A. F. Jr., Komolrit, K., Bhatla: *J. W. P. C. F.*, 35, 903 (1963).
- 14) Gaudy, A. F. Jr., Komolrit, K., Gaudy, E. T.: *Appl. Microbiol.*, 12, 1780 (1964).

(昭60. 3. 11受付)