

## 下水の高付加価値化に伴う汚泥減量化技術の開発

A study on sludge reduction technology with the high value-added of sewage

研究代表者 室蘭工業大学工学研究科 応用理化学系学科 教授 張 榕喆

### 1. 緒言

我々は廃水に着目し、廃水中に存在する有機炭素と毒性の有機化合物を原料としたバイオプラスチック生産を試みた。その結果、当研究室で単離した *Bacillus* sp. CYR1 株 (DDBJ accession number, LC049103) が広範囲のアルキルフェノール類を分解し、バイオプラスチックを生産することを見出した。また、人工廃水中の総有機炭素とフェノールをおよそ 56% の収率でバイオプラスチックに転換することが明らかとなった (特願 2015-117696)。一方、廃水の窒素濃度が高いとバイオプラスチックの生産効率が急激に低下することが示された。そこで、原料として確保が容易 (常に供給可能) な下水を用いたバイオプラスチック生産を検証した。さらに開発微生物は、バイオプラスチックを生産しながら化学的酸素要求量 (COD) を低減した。

一方、下水処理における世界的な懸案課題である余剰汚泥の減量化について検討した。下水道は我が国の年間消費電力量の約 0.7% を占める大口需要家 (100 万 kW 級の原子力発電所 1 基分の年間電力使用量 (国土交通省) であり、日本全国の CO<sub>2</sub> 排出量の 0.5% を占めている。現在下水処理に採用されている活性汚泥法は 100 年以上の歴史を持っている生物処理法であるが、処理過程で発生する余剰汚泥の処理費用は毎年増加しており、日本国内のみならず世界的な懸案課題である。これらの汚泥は、無機塩などから成る無機質汚泥、および活性汚泥法に代表される生物化学的廃水処理に由来する有機質汚泥から構成されている。特に有機質汚泥 (約 7,500 万トン) は容積にして年間約 4 億 m<sup>3</sup> (ドーム球場 345 個分) が余剰汚泥として排出されており、経済的かつ社会受容的な処理処分が必要不可欠である。実際に余剰汚泥の発生量 (一般廃棄物と同じ量の年間 7400 万 t 発生) をどの程度低減できるか、または下水の持続的な処理が可能かなど、実規模の実証実験が必要である。そこで本研究では、既存の処理方法の前処理法としての適用範囲について検証していくことを目的とした。

## 2 実験方法および材料

### 2.1 下水中における CYR1 株の至適初期菌体量の検討

バイオプラスチック普及の足かせとなっている原材料コストを削減するために、本研究ではバイオプラスチック生産原料として原料の確保が容易かつ、既存の集積システムより運搬の必要性がない下水に着目した。しかし、微生物が利用できる下水中の栄養源 (有機物量) は少ないため、予備実験では CYR1 株の初期菌体量を調整せずにただ添加しただけでは増殖が見られず、バイオプラスチックの生産も確認できなかった。そこ

で、CYR1 株が下水中で増殖するために適した初期菌体添加量を検討するため、室蘭市にて採取した下水 500 mL に、CYR1 株をそれぞれ OD<sub>600</sub> にて 0.01、0.03、0.06、0.08 となるように添加した。また、コントロールとして CYR1 株を添加しないものを用意した。それを 47 時間、30、100 rpm で振とう培養し、pH の経時変化、OD<sub>600</sub> にて増殖曲線を確認した。実験は 2 連で行った。

### 2.1.1 下水試料

実験には室蘭市蘭東下水処理場より採取した下水 (Fig. 1) を用いた。採取は沈砂池前の流入口で行った。採取後は 4℃ の暗所にて保存した。採取した下水の COD<sub>Mn</sub> と全窒素濃度を Table 1 に示す。

Table 1 下水 (室蘭市)

COD <sub>Mn</sub> [mg/L]	全窒素濃度 [mg/L]
約 60 ~ 100	約 20 ~ 30



Fig. 1 試料採取の様子 (室蘭市、蘭東下水処理場)

### 2.1.2 供試菌株

本実験では、*Bacillus* sp. CYR1 株を用いた。*Bacillus* 属は水中や土壌に普遍的に存在し、細胞内に内性胞子を形成する偏性好気性のグラム陽性桿菌で、非常に多くの種を含む。高温や高 pH、高塩濃度、高圧といった様々な極限環境に適応している種も多く、生存能力が高い。本菌株は当研究室の既報の論文において、バイオプラスチックの生産能力が確認されている。

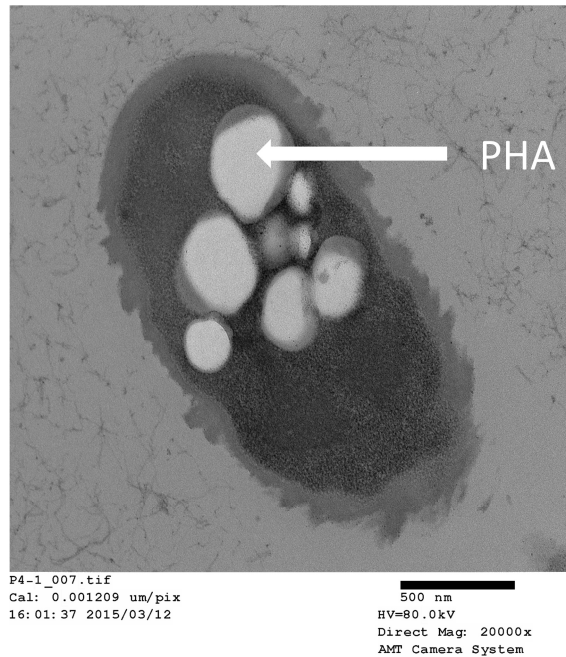


Fig. 2 *Bacillus* sp. CYR1 株の電子顕微鏡 (TEM) 画像

### 2.1.3 継代培養および前培養

菌株の継代培養には、寒天 2%を含む Nutrient Broth (NB) 寒天培地を用いた。90 mm×15 mm のプラスチックシャーレに平板寒天培地を作成し、白金耳にて CYR1 株を半~1 コロニー分とり画線を引き、30 で静置培養した。約 1~2 週間に 1 度植え継ぎを行った。使用した NB 培地の成分を Table 2 に示す。

実験の前に、十分な菌体量を得るために前培養を行った。300 mL 容三角フラスコに NB 液体培地を 100 mL 入れ、そこに白金耳 1 かき分の CYR1 株を添加し、30、100 rpm で約 10 時間振とう培養した。前培養後、下水に添加する前の準備として遠心分離 (4、10 分、6000 rpm) を行って、前培養液 200 mL から集菌し上澄み液を捨て、得られた菌体ペレットを下水で 25 mL になるように再懸濁した。

Table 2 NB 培地成分 (pH7.0)

成分	濃度[g/L]
ポリペプトン	10.0
酵母エキス	2.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0

### 2.1.4 培養方法

下水をホモジナイザーにより処理 (3 分、1200 rpm) し、下水中の大きな浮遊物質

を破碎した。その後、1N HCl または 1N NaOH を使用して pH7.0 に調整した。その調整した下水 500 mL を乾熱滅菌 (121 °C、2 時間) 済みの 1 L 容三角フラスコに入れ、前培養を下水に再懸濁した CYR1 株をそれぞれ OD<sub>600</sub> にて 0.01、0.03、0.06、0.08 となるようにクリーンベンチ内で添加した (各 2 本)。コントロールとして CYR1 株を添加しないものを用意した (2 本)。三角フラスコにオートクレーブで滅菌 (121 °C、20 分) した通気性のシリコ栓でふたをし、30 °C のインキュベーター内で振とう培養 (47 時間、100 rpm) した。サンプリングは、菌添加前、0 (菌添加直後)、15、24、38、47 時間目の計 6 回行い、培養液を約 5 mL、3 点採取した。

### 2.1.5 分析方法

採取した試料中の大きな浮遊物質を除くために金属製のふるい (JIS SCREEN SCALE OPENING 500 μm、WIRE DIA 0.290 mm、MESH 32) を用いてろ過し、分光光度計を用いてろ液の OD<sub>600</sub> を測定した。OD<sub>600</sub> を測定する際のゼロ点は脱イオン水でとり、各フラスコにおける菌添加前のろ過した下水をブランクとし、一つのサンプルにつき 3 回測定した。また、pH メーターを用いて試料の pH を測定した。

### 2.1.6 バイオプラスチック抽出方法

培養終了後の培養液 (菌を添加した 8 本分) を 500 mL 容遠沈管 (NALGEN、ポリプロピレン共重合体製) 数本に移して高速冷却遠心機を用いて遠心分離 (4 °C、10 分、10000 rpm) をし、得られたペレットをエタノールで再懸濁、洗浄しつつ 50 mL 容遠沈管 (labcon、ポリプロピレン製) 1 本に移した。それを遠心分離 (4 °C、10 分、10000 rpm) し、上澄み液を捨て得られたペレットをアセトンで再懸濁し洗浄した。アセトンで懸濁したものを遠心分離 (4 °C、10 分、10000 rpm) し、上澄み液を捨て得られたペレットを次亜塩素酸ナトリウム溶液で再懸濁しガラス製遠沈管 (IWAKI、TE-32) 1 本に移した。その懸濁液を超音波破碎機にて細胞破碎し、室温、120 rpm で 4 時間振とうした。なお細胞破碎は、Cycle 50、Output 3、破碎処理 3 分、冷却時間 1 分を 3 セット以上、懸濁液中の浮遊物質がなくなるまで行った。

その後、スイング式遠心分離機を用いて遠心分離 (室温、10 分、3000 rpm) し、上澄み液を捨て得られたペレットをアセトンで再懸濁し洗浄した。アセトンで懸濁したものを遠心分離 (室温、10 分、3000 rpm) し、上澄み液を捨て得られたペレットをエタノールで再懸濁し洗浄した。エタノールで懸濁したものを遠心分離 (室温、10 分、3000 rpm) し、上澄み液を捨てた。得られたペレットを熱したクロロホルム約 30 mL で再懸濁することで、ペレット中のバイオプラスチックをクロロホルムに溶かした。それをウォーターバスにて 60 °C、100 rpm で一晩振とうした。

振とう終了後、ろ紙 (Advantec、定性ろ紙 No. 1、90 mm) を用いてクロロホルムが冷めないように注意しながら 100 mL 容ナス型フラスコ (TS 規格 29/42) 中にろ

過し、溶液中から細胞片などのゴミを取り除いた。最後に、60 ℃のウォーターバスにナス型フラスコをつけながらロータリーエバポレーターを用いてクロロホルムを揮発させバイオプラスチックを析出させた。フラスコ中に析出したバイオプラスチックを冷やしたエタノールであらかじめ秤量済みのアルミカップに移し、50 ℃の乾熱乾燥機中でエタノールを揮発させ乾燥させた。それを秤量しバイオプラスチックの重量を求めた。

## 2.2 汚泥減量化: 特に包括固定化法の有用性について

活性汚泥法により発生する余剰汚泥の発生量の減少を達成するために、溶液中のTOC (Total Organic Carbon) (全有機炭素) 濃度を減少させることを目標とした。今回用いた菌株は *Bacillus* sp. CYR1 株を含むバイオプラスチック生産混合菌であった。前培養や本培養の際には PGY (peptone-glucose-yeast) 培地を用い、寒天上で培養でも同種の培地を用いた。PGY 液体培地は pH7 に調整し、組成はペプトン 2 g/l、酵母エキス 1 g/l、グルコース 0.5 g/l、であり、本実験では低栄養条件での培養を目的とするために用いた。

予備実験で混合菌の増殖曲線を作成し、その結果をもとに 8 時間 ~ 18 時間にて前培養を行った。前培養後 6000 rpm、10 分、4 ℃ で遠心分離を行い集菌した後、生理食塩水 (NaCl 濃度 9 g/l) に懸濁し 6000 rpm、10 分、4 ℃ で集菌して洗浄した。その後上清を捨て、再び生理食塩水に懸濁し洗浄を行った。再び上清を捨て、生理食塩水に懸濁し 20 分間静置した。その後同様に集菌し洗浄を終了し実験に用いた。混合菌をそれぞれ集菌した後、菌体ペレットを取り出しその湿潤重量を測定した。湿潤重量を測定した混合菌をそれぞれ計 4.2 g 混ぜ人工下水 100 ml を 300 ml フラスコに入れて 100 rpm、30 ℃ にて実験を行った。下水に元々存在している微生物の影響を取り除くために、本実験では下水の組成を人工下水によって再現した。その組成を以下に示す (Table 3)。

Table 3 人工下水組成

グルコース	150 mg/l
塩化アンモニウム	80 mg/l
硫酸マグネシウム	5 mg/l
リン酸二水素カリウム	10 mg/l
塩化カルシウム	7 mg/l
塩化鉄・六水和物	1 mg/l
塩化カリウム	7 mg/l
リン酸水素二ナトリウム・12 水和物	30 mg/l
グルタミン	150 mg/l

人工下水作成の際には、メイラード反応を予防するためにグルタミン以外すべてを純水に溶かしてグルタミンのみを別の純水に溶かした。それぞれをオートクレーブ滅菌し、

滅菌後にクリーンベンチ内で混合し人工下水を作成した。

また、次の実験として MLSS の値として 1000、2000、3000 ppm となるように混合菌をそれぞれ計 0.78 g、1.56 g、2.34 g ずつ混ぜ実験を行った。その混ぜた菌株をそれぞれ 5 ml の生理食塩水に混合し、均一になるまで混合した。包括固定化法にはアルギン酸ナトリウムを用い、45 ml の純水に対して 65 mg のアルギン酸ナトリウムを徐々に加えて均一になるまで混合した。そこに先ほどの生理食塩水に溶解した混合菌株を加え、ゆっくりと均一になるまで混合した。それを 10 ml シリンジを用いて 0.1 mol/l の塩化カルシウム溶液に一滴ずつ落としていきアルギン酸カルシウムのゲルを作成した。なお、それぞれの担体における菌株量の偏りを防ぐために菌株を混合した生理食塩水は常に弱く攪拌を行い維持し、素早く担体の作成を行った。その後、作成したゲルを生理食塩水によって 3 度洗浄した。先ほどと同様に 300 ml フラスコに 100 ml の人工下水を調整し、そこに菌株入りのアルギン酸カルシウムのゲルを入れて 100 rpm 30 で振盪を行った。その後に処理後の人工下水や担体のサンプリングを行い担体内のタンパク質濃度や人工下水の TOC の変化を観察した。TOC の測定の際にはサンプルを 8000 rpm、10 分、4 で遠心分離を行い上清のみを取り出した。その上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンに通してろ過を行い、その後 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンでろ過を行い不純物の除去を行ったその後 TOC analyzer ( 共立化学 ) を用いて測定を行った。タンパク質の測定には BCA ( Bicinchoninic Acid ) 法を用いた。BCA 法を用いた際にはサンプルとして担体を 4 個取り出して薬さじの背や超音波破碎、ピペッティングなどを用いてサンプルを砕いた。その後、希釈したサンプル 1 ml と試薬 1 ml を混合した。次いでヒートブロックを用い 60 、60 分で反応させた。その後常温に戻してから 10 分静置した後、分光光度計を用い 562 nm にて測定を行った。その結果を検量線に照らし合わせて結果を得た。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 各初期 OD<sub>600</sub> 値における増殖曲線

下水に CYR1 株を OD<sub>600</sub> にて初期値でそれぞれ 0.01、0.03、0.06、0.08 となるように添加したサンプルの OD<sub>600</sub>、pH の結果を以下に示した。結果はすべて 2 連の平均値を用いた。

Fig. 3 より、初期 OD<sub>600</sub> 値 0.01 と 0.03 において菌体の増殖を確認した。0.01 では、24 時間目まで増殖し最大で 0.027 となった。24 時間目以降は 0.03 と比べ緩やかに減少した。0.03 では、15 時間目まで増殖し最大で 0.051 となった。15 時間目以降は 38 時間目まで減少し ( 0.031 )、38~47 時間目にかけて再び増殖し 0.040 となった。一方、0.06、0.08 は菌体の減少を確認した。0.06 では、0.08 と比べ緩やかに減少を続け 47 時間目において 0.033 となった。0.08 では、38 時間目まで減少した ( 0.025 )、その後 47 時間目まで増殖し、0.039 となった。

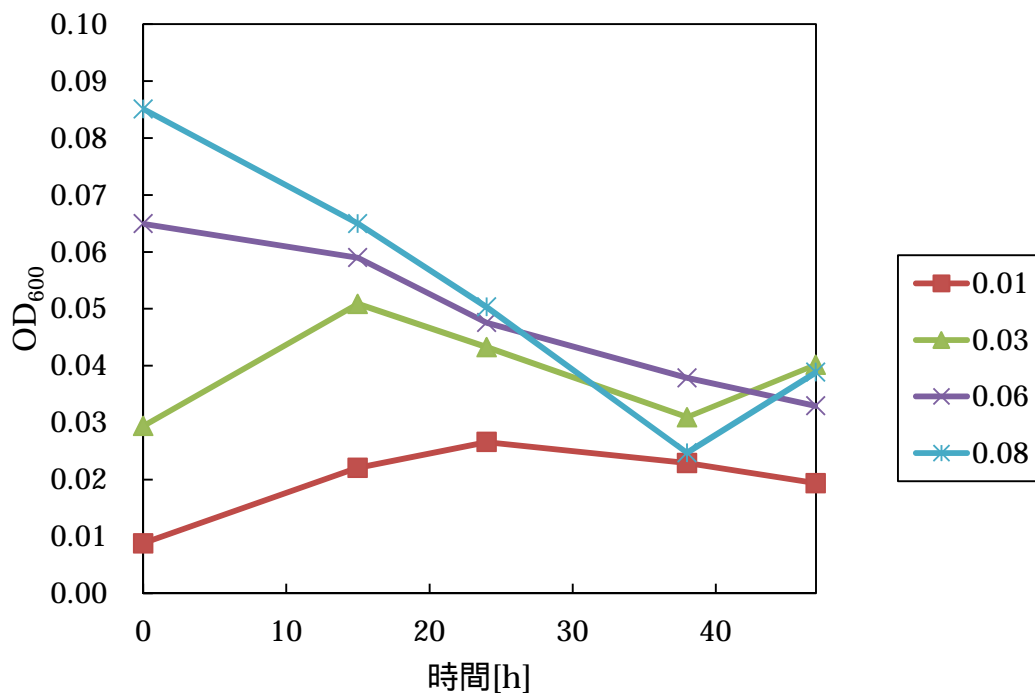
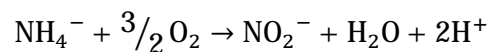


Fig. 3 各初期 OD<sub>600</sub> 値におけるコントロール差し引き後の増殖曲線

### 3.2 各初期 OD<sub>600</sub> 値における pH の経時変化

各初期 OD<sub>600</sub> 値における pH の経時変化を Fig. 4 に示した。pH の変化はすべてのフラスコにおいて類似していた。約 6.9~7.7 の間を変動し、24 時間目以降 pH は減少した。47 時間目においてコントロールは約 7.3、0.01 と 0.03 は約 7.1、0.06 と 0.08 は約 6.9 となった。各初期 OD<sub>600</sub> 値における pH の経時変化 (Fig. 4) では、コントロールと全てのサンプルで時間が経過するにつれて pH の低下が見られた。一般に、土壤に含まれている硝酸性細菌、亜硝酸性細菌は、アンモニア性窒素などを硝酸窒素、亜硝酸性窒素に硝化する際に、以下の(3)式のような反応を行う事から pH は低下する。



室蘭市、蘭東下水処理場は生活排水と雨水をまとめて処理しているため (私信、蘭東下水処理場職員より)、雨水中に土壤の硝酸性細菌、亜硝酸性細菌を含んでいる可能性が高い。本研究ではその細菌が下水中で硝化を行ったことにより、下水の pH が低下したと考える。

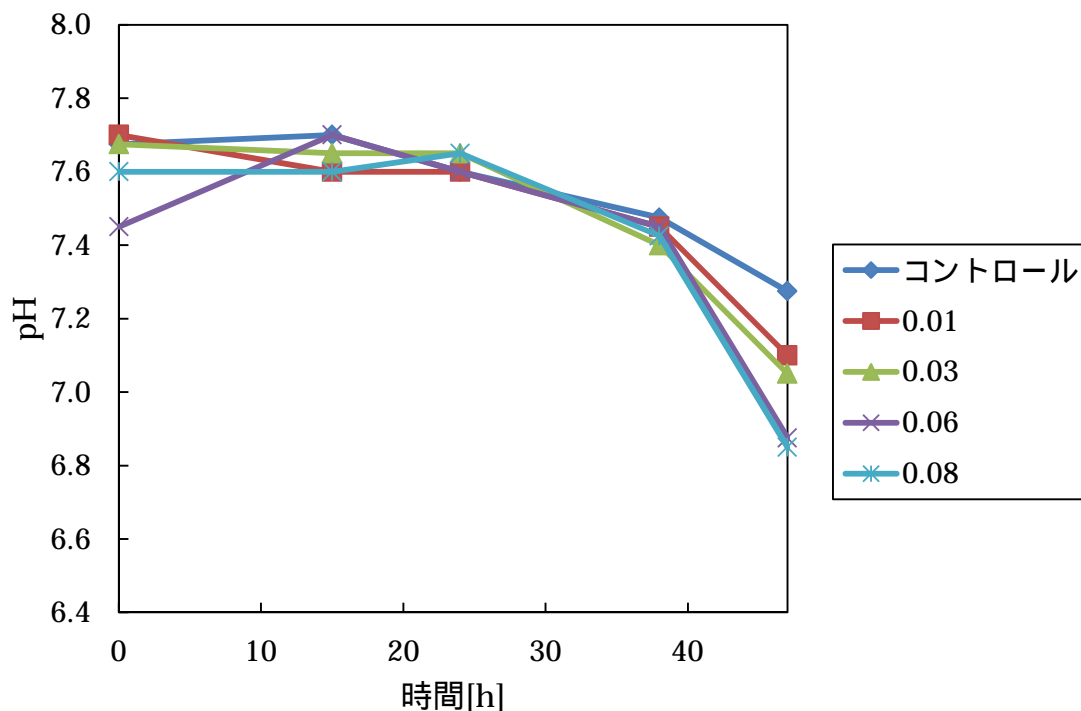


Fig. 4 各初期 OD<sub>600</sub> 値における pH の経時変化

### 3.3 バイオプラスチック生産量

バイオプラスチックを抽出し秤量した結果を Table 4 に示した。バイオプラスチック抽出に用いた三角フラスコ 8 本分の培養液量は 3.4 L であった。抽出に用いた液量に対しごく微量ではあるが、CYR1 株を用いた下水からのバイオプラスチックの生産を確認した。また抽出されたバイオプラスチック重量を、抽出に用いた下水の液量 (3.4 L) で割り、下水 1 L あたりの PHA 重量を求めた。一方、下水を 3 倍濃縮した条件において 3 倍の PHA 生産が確認できた。従って、下水の濃度が高いほど生産量が増えると考えられる。Fig. 5 に下水中に存在する CYR1 株菌体の中で生産されたバイオプラスチックの TEM 写真を示した。

Table 4 バイオプラスチック抽出結果

バイオプラスチック (PHA) 重量 [mg]	下水 1 L あたりの PHA 重量 [mg/L]
2.0	0.60



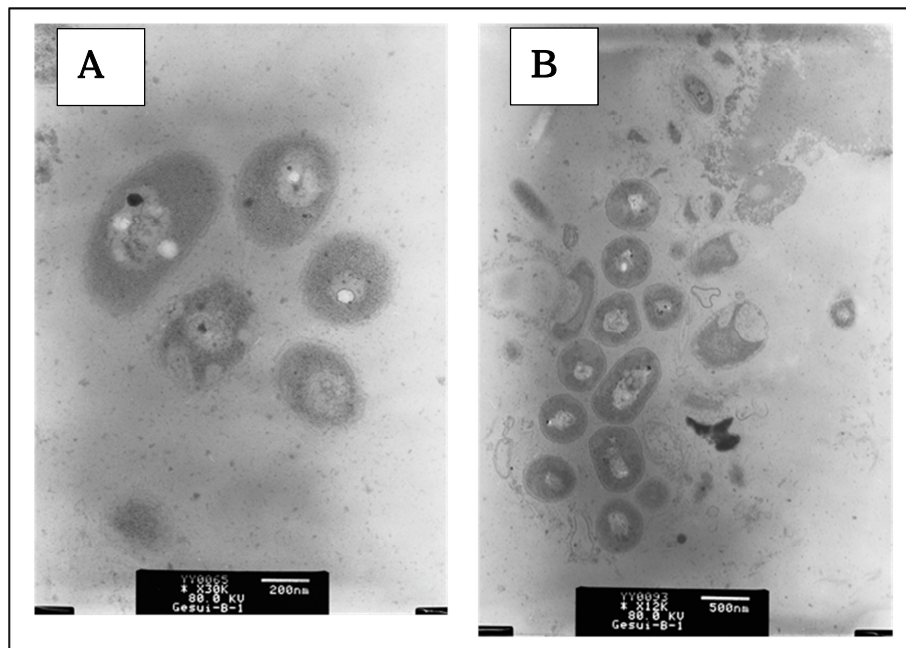


Fig. 5 A) CYR1 菌株とバイオプラスチック生産写真、B) CYR1 菌株と他の微生物の TEM 画像

### 3.4 汚泥減量化: 特に包括固定化法の有用性について

様々な余剰汚泥処理技術(オゾン法、酵素法、アルカリ法、機械的および超音波分解法、熱分解法、電解酸化法、水熱反応法、自己酸化法、食物連鎖法)が提案されている。その中でも微生物が有する生物化学的機能を利用する方法や微生物の食物連鎖機構を利用する方法がコストと環境親和的な手法として注目されている。しかし、両方法とも汚泥の発生量を事前に減量する方法ではなく、発生後の汚泥を分解、減量化するもので根本的な処理方法とは言えない。一方、今回の方法は活性汚泥法による処理の前処理として汚泥を使わずに TOC 濃度を低減させてその前処理後に活性汚泥で処理することにより発生する余剰汚泥の量を減量できると考えた。

本実験では活性汚泥法で生産される多量の余剰汚泥を発生後に処理をするのではなく前処理を行うことで減少させるための取り組みを研究した。そこで、本研究室で単離された 3 種類の菌をそれぞれ集菌した後菌体ペレットを取り出しその湿潤重量を測定した。

混合菌を包括固定化法によって固定化したものを人工下水に接種し溶液中の変化を観察した。その際に担体中の初期菌体量を湿潤重量で 0.77 g (MLSS 1000 ppm)、1.54 g (MLSS 2000 ppm)、2.31 g (MLSS 3000 ppm)となるように調節した。0 h、48 h、120 h にサンプリングを行い TOC 濃度を測定したところ、48 h において菌体量が 1.54 g の時にわずかながら TOC の減少量が多かったため(データ省略)、次の実験は菌体量を

湿潤重量で 1.54 g として行った。

包括固定化を用いて作成した担体を人工下水の処理に用いた場合、24 時間で人工下水の入れ替えを行った。その際には担体のみを取り出し人工下水で担体をすすぎ、新たに作成した人工下水 100 ml に接種して観察を行った。それをまた 24 時間後に取り出し、すすいで再利用という手順を担体の崩壊により再利用できなくなるまで(12 回目)行った。その結果を以下に示した (Fig. 6)。

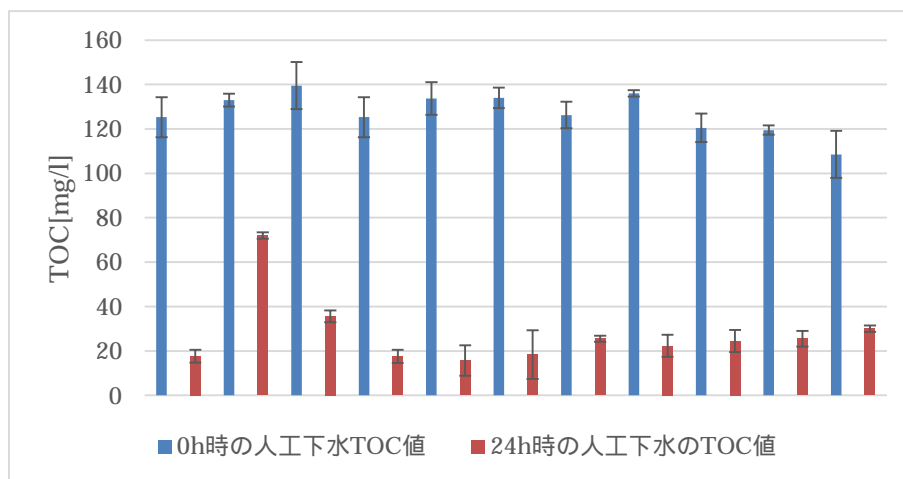


Fig. 6 担体内菌体濃度を 2000 ppm としたときの 24 時間経過時の TOC 変化

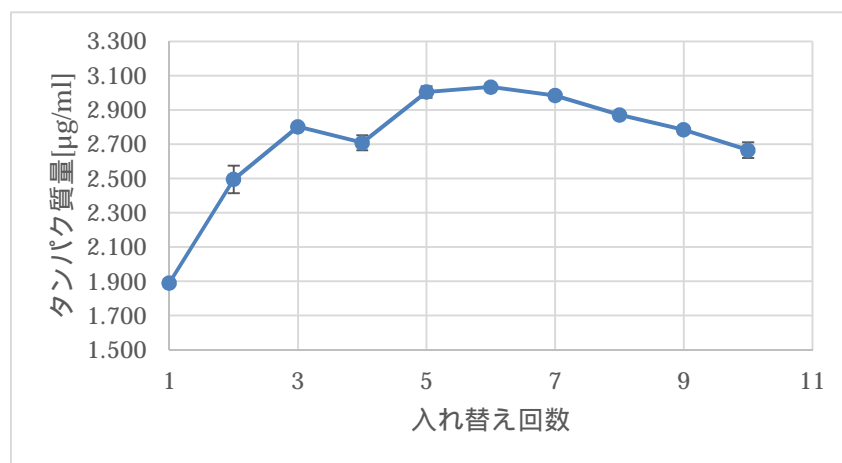


Fig. 7 2000 ppm における人工下水の入れ替え数による担体内のタンパク質量の推移

最も TOC の除去率が高かった 5~6 回目において担体内のタンパク質濃度が高く、その後は徐々に TOC の除去率の減少が見られた (Fig. 6) それと同時に担体内のタンパク質濃度が緩やかに減少していることが分かった (Fig. 7)。しかし、今回の実験では時間経過とともに除去効率の低下が見られた。時間とともに担体が水分を多く含むことによって起こる膨張による耐久度の低下、振盪による担体同士の接触による削れ、それに伴い回収し再利用できる担体量の減少などが考えられる。担体による処理を行うことに

より懸濁菌体を下水に直接入れていた際に発生していた MLSS や TOC の初期値の増加という問題は防ぐことができた。また、処理後の MLSS の値が 1 回~9 回目までは増加しなかったため、下水の予備処理を目的とした場合、利用できると考えられる。

#### 4 . 結言

本研究では、下水の高付加価値化を目指すうえで重要な基礎データを蓄積するため、下水をターゲット基質とし、バイオプラスチックの生産可能性を検討した。その結果、様々な微生物が共存する下水ではあるものの、バイオプラスチックが生産できることが示唆された。しかし、実用化を目指すためには生産量を増やす必要があり、今後 pH を一定に保つなど培養条件をさらに検討していく必要があると考えられる。

一方、アルギン酸カルシウムゲルを担体とした包括固定菌を用いた人工下水の連続回分式処理実験においては、TOC 濃度の低減が見られ、8~9 回目までは MLSS 濃度の増加を押さえながら繰り返し処理を行えることが分かった。従って活性汚泥処理の前処理法としての利用可能性が示唆された。今後、耐久性の優れた他の担体への固定法を開発し、前処理法だけではなく活性汚泥処理との併用可能性をさらに検討し、どの程度汚泥減量化が可能になるのかを数値化・定量化していく必要がある。

#### 謝辞

本研究は「公益財団法人 JFE21 世紀財団」の研究助成により実施されたものであります。ここに記して感謝の意を表します。

#### 参考文献

1. A. Hokamura, I. Wakida, Y. Miyahara, T. Tsuge, H. Shiratsuchi, K. Tanaka and H. Matsusaki, *J. Biosci. Bioeng.*, 2015, **120**, 305-310.
2. R. Kadoya, K. Matsumoto, T. Ooi and S. Taguchi, *PLoS One.*, 2015, **10**, e0125163.
3. S. Ishizaki, K. Terada, H. Miyake and S. Okabe, *Environ. Sci Technol.*, 2016, **50**, 9515-9523.
4. Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism, Japan, <http://www.mlit.go.jp/en/index.html>.
5. M. V. Reddy, Y. Yajima, Y. Mawatari, T. Hoshino and Y. C. Chang, *Green Chem.*, 2015, **17**, 4560-4569.
6. M. V. Reddy, Y. Mawatari, Y. Yajima, C. Seki, T. Hoshino and Y. C. Chang, *Bioresour. Technol.*, 2015, **192**, 711-717.