

高い細菌吸着能を持つ高機能活性汚泥フロックの開発

研究代表者 北海道大学 大学院工学研究院 環境工学部門 助教 中屋 佑紀

共同研究者 北海道大学 大学院工学研究院 環境工学部門 教授 佐藤 久

1. 緒言

活性汚泥法による下 wastewater 処理では、微生物が活性汚泥フロックを形成し生分解性有機物を吸着・分解することが知られている[1]。一方、我々のこれまでの研究により、下水処理場の活性汚泥フロックへの大腸菌吸着率は通常の条件では 99%程度であるが、活性汚泥濃度が低下すると著しく低下することが明らかとなった。また、下水処理場によって大腸菌吸着率に有意な差がみられることも分かってきた。この結果は、活性汚泥フロックは細菌吸着能を有するが、その能力は容易に変わり得る事を示している。活性汚泥フロックの細菌吸着メカニズムを明らかにし活性汚泥法で細菌、特に病原細菌の除去効率を増大させる事ができれば、世界中の下水処理効率を高められる。

また、2022 年度より日本における水域の環境基準項目のうち大腸菌群数が大腸菌数に変更され、排水基準（下水処理場からの排水も含む）に関しても同様の変更がなされる可能性がある。下水処理水中の大腸菌数の推定の必要性は今後増していくと考えられ、下 wastewater 処理における大腸菌の吸着除去現象は注目に値する。

本研究は、細菌吸着能力の点で高機能な活性汚泥フロックを開発することを目的としており、細菌の代表として大腸菌に着目している。さらに、高機能な活性汚泥を維持できるような活性汚泥反応タンクの運転条件や、活性汚泥表面に存在する細胞外高分子物質（Extracellular polymeric substances: EPS）の特徴を見出すことを目指している。そのためにはまず、活性汚泥の大腸菌吸着能力に差が出るような活性汚泥と大腸菌の接触条件を見出したり、そもそも大腸菌吸着能力に差がある活性汚泥を用意したりする必要がある。そして、大腸菌吸着能力を変化させる因子を絞り込み、能力の低下した活性汚泥を回復させたり、活性汚泥の高機能状態を維持したりできるような運転条件や添加材を検討したい。そこで今回は、反応タンクの模擬的な運転条件として曝気量と攪拌強度による影響を考察し、大腸菌吸着能力の低い活性汚泥を実験的に得るための条件検討として活性汚泥の無曝気攪拌による劣化の影響を調べた。

2. 実験方法

2.1 実験の概要

本研究では、ともに活性汚泥法を採用する A 下水処理場、B 下水処理場から初沈出水と活性汚泥を採取した。下水処理場の概要は先行研究を参照されたい（処理場名を表す記号は共通のものとした）[2,3,4]。これらを混合し様々な条件で曝気・攪拌したのち、汚泥を沈降させ上澄み中の大腸菌数を測定した。初沈出水中の大腸菌数と上澄み中の大腸菌数が

ら大腸菌吸着率を求め、これを細菌吸着能力の指標と考えた。具体的な実験方法を以下に記載する。

2.2 大腸菌数の定量

本研究では、大腸菌数の定量に寒天平板培地希釈法（混釈法）を採用した。培地にはクロモカルトコリフォーム寒天培地（Merck 製）を用い、培養後の培地上のコロニー数が 30～300 cfu の範囲に収まるようにした。ここで、試料の希釈には塩化ナトリウム（和光純薬試薬特級）を超純水に溶解させて作成した 0.9% NaCl 水溶液を用いた。

2.3 活性汚泥への大腸菌吸着率の算出方法

初沈出水と活性汚泥を混合し曝気・攪拌したのち汚泥を沈降させ、上澄みと汚泥を分離した（図 2.1）。大腸菌吸着率は以下の式により定義した。

$$\begin{aligned}
 & \text{大腸菌吸着率} \\
 &= \frac{\text{活性汚泥中に存在する混合前の初沈出水に由来する大腸菌数}}{\text{混合前の初沈出水中の総大腸菌数} \cdots \text{①}} \\
 &= \frac{\text{①} - (\text{混合後の上澄み大腸菌数} - \text{実験中に活性汚泥から剥がれた大腸菌数})}{\text{①}}
 \end{aligned}$$

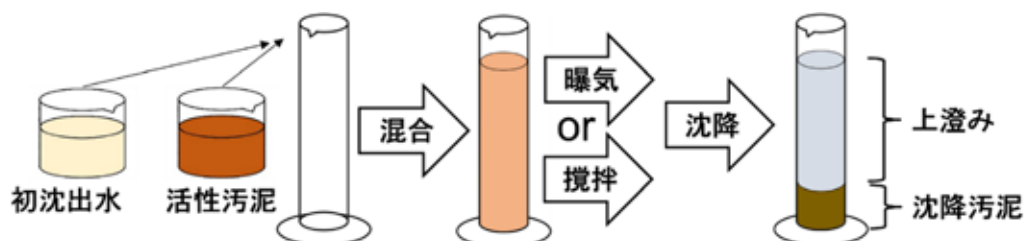


図 2.1 実験手順の概念図

実験中に活性汚泥から剥がれた大腸菌数は、ネガティブコントロール実験（図 2.2）により推定した。すなわち、吸着実験と同様の曝気や攪拌の条件で、初沈出水を加えず活性汚泥のみの実験を行った。これは系の初めと終わりしか見ていないが、吸着実験途中の大腸菌の増減（増殖，死滅，沈降）は無視できるほど小さいとした。

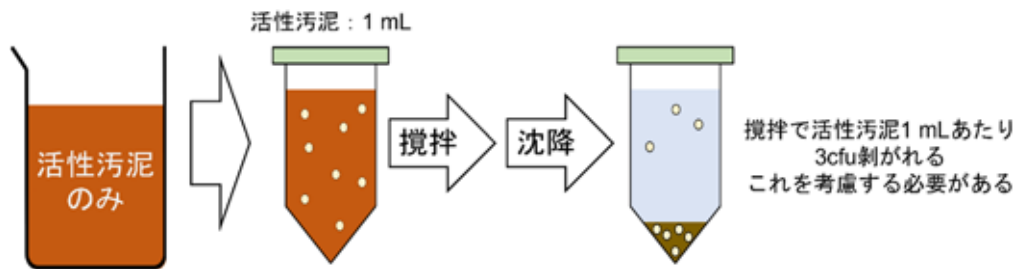


図 2.2 大腸菌吸着率を求めるときのネガティブコントロール実験の概念図

2.4 G 値の計算方法

攪拌にジャーテスターを用いた場合の攪拌強度に相当する G 値の算出方法について記載する。本研究で用いたジャーテスター（宮本製作所製）のプロペラの模式図を図 2.3 に示す。G 値（ G ）の計算には以下の式を用いた。

$$G = \left(\frac{C \cdot A \cdot v^3}{2\gamma \cdot V} \right)^{0.5}$$

ここで、攪拌係数 $C=1.5$ ，攪拌翼面積 $A=0.001596 \text{ m}^2$ ，攪拌槽面積 $V=0.0007 \text{ m}^3$ ， 20°C での動粘性係数 $\gamma=0.00000107 \text{ m}^2/\text{s}$ とし、攪拌翼の平均速度 v は以下の式により求めた。

$$v = \frac{2}{3} \times 2 \times \pi \times r \times \frac{N}{60}$$

ここで、攪拌翼の半径 r は 3.35 cm であり、攪拌翼の回転数 $N(\text{rpm})$ は攪拌翼の目視とストップウォッチにより計測した。

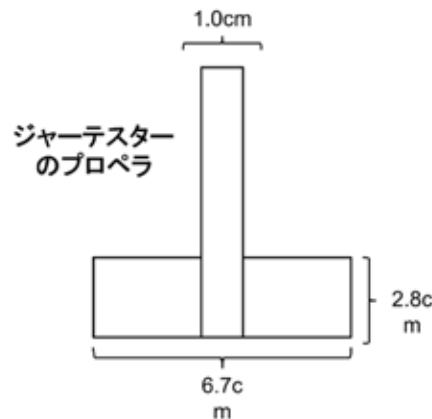


図 2.3 ジャーテスターのプロペラの模式図

2.5 実験(1) 曝気量の影響の検討

曝気量が 大腸菌吸着に与える影響を検討するため、B 下水処理場の初沈出水と活性汚泥を用いて以下の実験を行った。1 L メスシリンダーに活性汚泥 900 mL を満たし、大腸菌源として初沈出水 100 mL を添加し、エアポンプで空気のみを通气した（概念図：図 2.4）。曝気量は 0.2，0.5 L/min の二通りとした。計 7 h 曝気し、曝気時間が 1，3，5，7 h での

大腸菌吸着率をそれぞれ測定した。ここで、曝気中には試料が懸濁しており上澄みを得ることができないため、それぞれの時間でメスシリンダーから試料を 10 mL 採取し、30 min 静置させて得た上澄み水中の大腸菌を測定した。初沈出水中の大腸菌数も測定しておき、大腸菌吸着率を算出した。

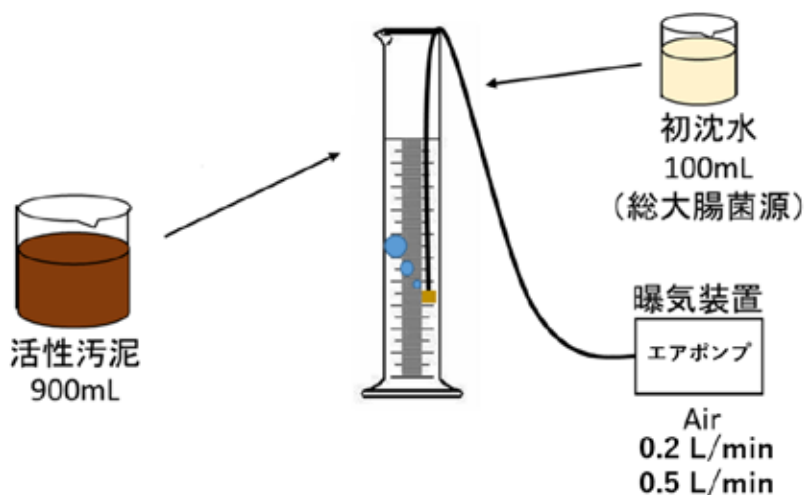


図 2.4 実験(1)の概念図

2.6 実験(2) 攪拌強度および DO 濃度の影響の検討

攪拌強度および DO 濃度が大腸菌吸着に与える影響を検討するため、A 下水処理場および B 下水処理場の初沈出水と活性汚泥を用いて以下の実験を行った。1 L ビーカーに活性汚泥 630 mL を入れ、大腸菌源として初沈出水 70 mL を添加し、ジャーテスターを用いて攪拌した（概念図：図 2.5）。DO 濃度が大腸菌吸着率に与える影響を調べるため、低 DO 濃度と高 DO 濃度の二種類の実験条件を用意した。低 DO 濃度条件は、活性汚泥が初沈出水と混合することで BOD 濃度が高く微生物を多量に含む系となるので、自然に DO 濃度が低下することを利用して用意できた。一方、ビーカーの液相上部を攪拌強度が変わらない程度にエアポンプで曝気することで高 DO 濃度条件を用意した。攪拌強度が大腸菌吸着に与える影響を調べるために、低 DO 濃度条件、高 DO 濃度条件ともに 50, 100, 150 rpm でサンプルを攪拌した。回転数と攪拌羽の面積から G 値を求めた。攪拌時間 1, 3, 3.5, 5 h で実験(1)と同様に試料のうち 10 mL を分取し、大腸菌数と DO 濃度（東亜 DKK 製 DO 計を使用）を測定した。

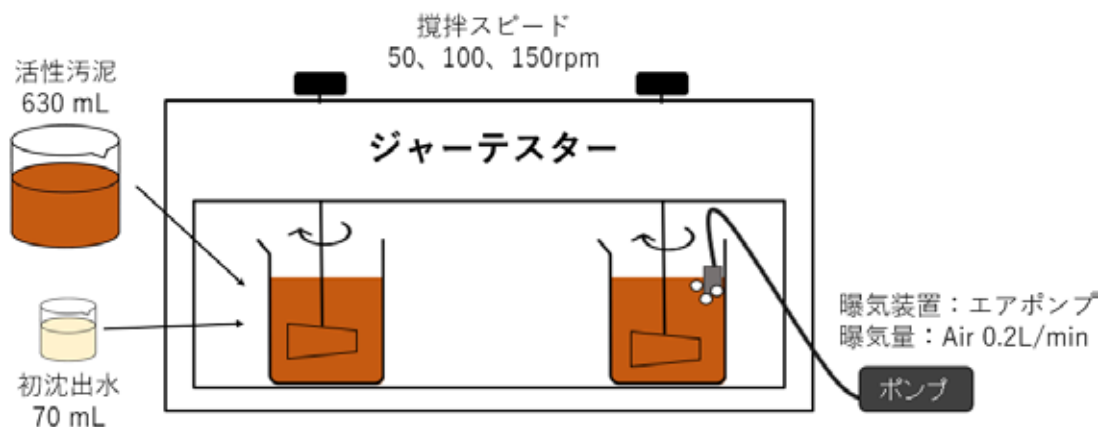


図 2.5 実験(2)の概念図

2.7 実験(3) 活性汚泥劣化実験

活性汚泥の劣化が大腸菌吸着に与える影響を検討するため、A 下水処理場の初沈出水と活性汚泥を用いて以下の実験を行った。採取後すぐ実験を行った活性汚泥を新鮮な活性汚泥と定義した。一方、ジャーテスターで 24 h、50 rpm、無曝気で攪拌させた活性汚泥を劣化した活性汚泥と定義した（概念図：図 2.6）。1 L ビーカーに（新鮮な/劣化した）活性汚泥 630 mL を入れ、総大腸菌源として初沈出水 70 mL を添加し、ジャーテスターを用いて 50 rpm で攪拌した。攪拌時間 10, 30, 60 min で実験(1)と同様に試料のうち 25 mL を分取し、大腸菌数を測定した。

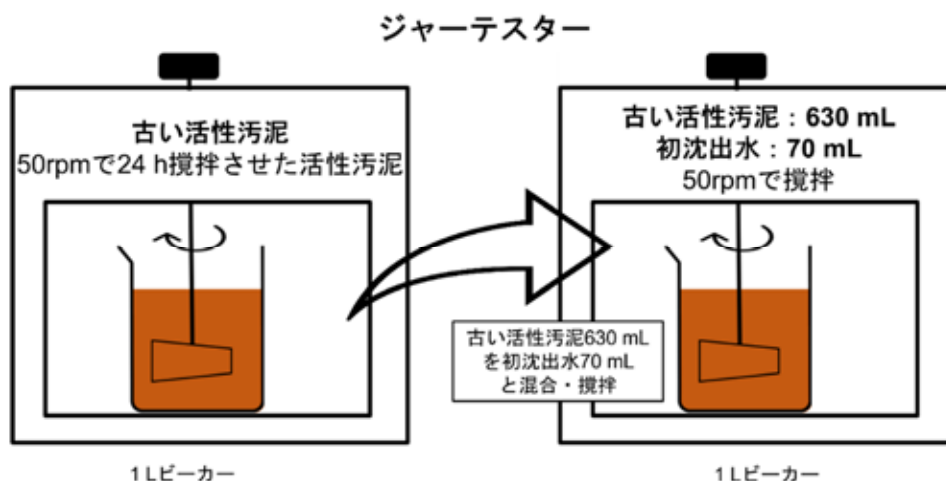


図 2.6 活性汚泥劣化実験の概念図

ここで、新鮮/劣化によって活性汚泥中の EPS 量が増減し大腸菌吸着率に影響を与えることを期待して EPS の分析も行った。EPS 量は EPS 中の NPOC（不揮発性有機炭素）量とし、TOC 計（Shimadzu 製）により測定した。EPS の抽出方法には、先行研究に基づき熱抽出法を用いた[5]。熱抽出法の概要を図 2.7 に示す。ここで、EPS 量を 1 g の乾燥汚泥あたりの量として求めるため、EPS 抽出後のペレットをガラス繊維ろ紙（東洋濾紙製 GA-55）で吸引ろ過し、乾燥機で 110 °C、24 h 乾燥させた（概念図：図 2.8）。乾燥前と乾燥後のフィルター重量の差から乾燥汚泥量を求めた。

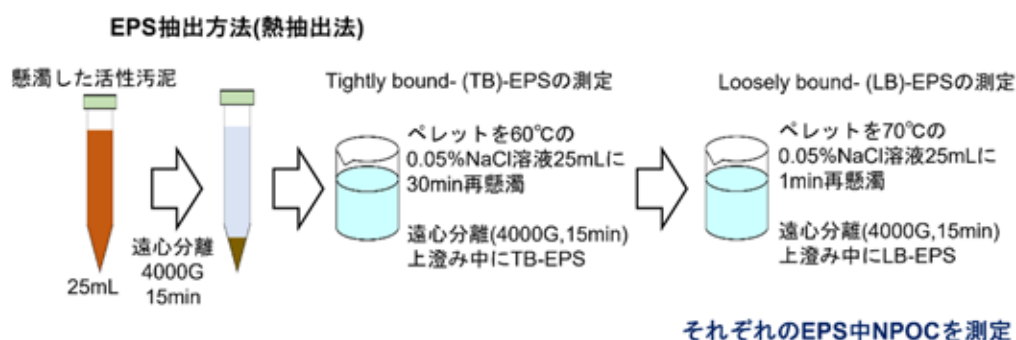


図 2.7 熱抽出法による EPS の抽出の概略

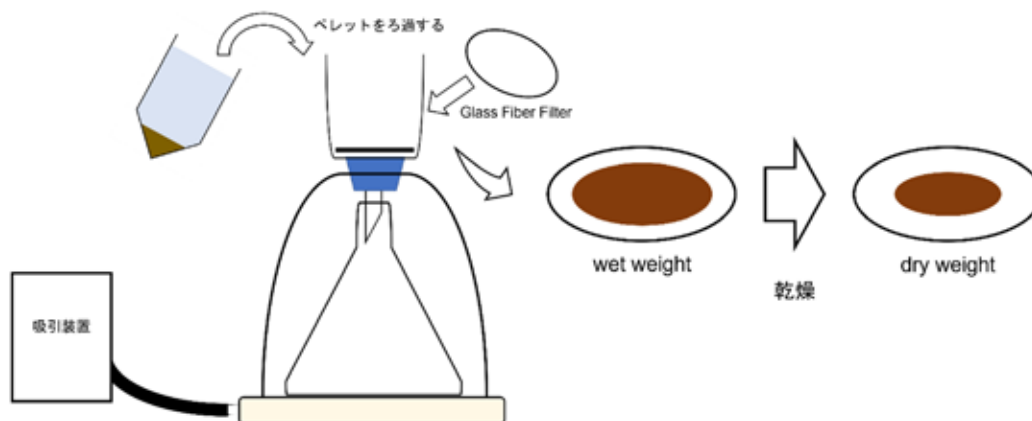


図 2.8 吸引ろ過を用いた乾燥汚泥量測定概念図

3. 結果と考察

3.1 実験(1) 曝気量の影響の検討

曝気量 0.2 および 0.5 L/min における大腸菌吸着率の経時変化を図 3.1 に示す。大腸菌吸着率は 0.2 L/min、0.5 L/min とともに 1 h で 90%以上に、3 h で 99%と非常に高くなった。一方、曝気時間が 3 h 以降では吸着率は上昇しなかった。この結果から、本実験の初沈出水/活性汚泥比で大腸菌吸着が定常に達するには少なくとも 3 h の曝気時間が必要であることが示唆された。この実験で DO 濃度は両条件とも約 8 mg/L であった。本研究で

は曝気時間 1 h において曝気量が $E. coli$ 吸着率に影響を与えた。ここで、攪拌強度は活性汚泥への $E. coli$ の輸送にも活性汚泥からの $E. coli$ の脱着にも影響を与えられられるが、曝気による攪拌強度を定量的に把握することは難しく、吸着実験開始から 1 h 以内に見られた吸着率の差が攪拌の影響によるものなのか定量的な結論を出すことができなかった。そこで、次に DO 濃度と攪拌強度 (G 値) それぞれが $E. coli$ 吸着率に与える影響を検討することにした。

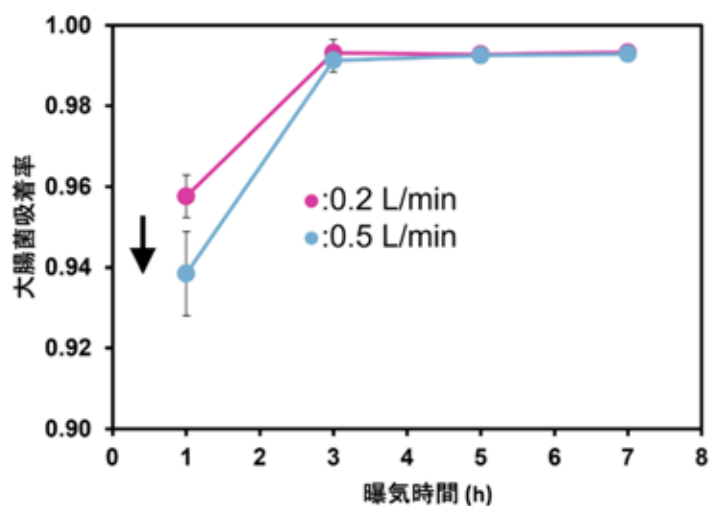


図 3.1 曝気量 0.2 および 0.5 L/min における $E. coli$ 吸着率の経時変化

3.2 実験(2) 攪拌強度および DO 濃度の影響の検討

低 DO 濃度条件および高 DO 濃度条件における DO 濃度と $E. coli$ 吸着率の経時変化をそれぞれ図 3.2 および図 3.3 に示す。低 DO 濃度条件では、G 値の増加とともに $E. coli$ 吸着率が高くなった。一方、高 DO 濃度条件では 3 h 以降の吸着率はほぼ同じであった。このことから $E. coli$ 吸着は定常に達したものと考えられた。定常に達した攪拌時間 3 h 以降では、G 値が 147 /s、244 /s では、DO 濃度が高くてても低くても吸着率はほぼ同じであり、G 値が 37 /s の時のみ高 DO 濃度条件において吸着率が高くなった。

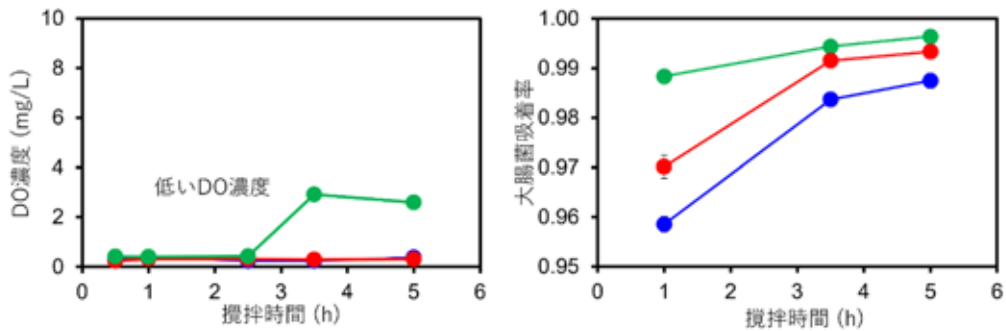


図 3.2 低 DO 濃度条件における DO 濃度と大腸菌吸着率の経時変化
(ここで、●は回転数 150 rpm, G 値 244 /s での結果, ●は回転数 100 rpm,
G 値 147 /s での結果, ●は回転数 50 rpm, G 値 37 /s での結果を表す)

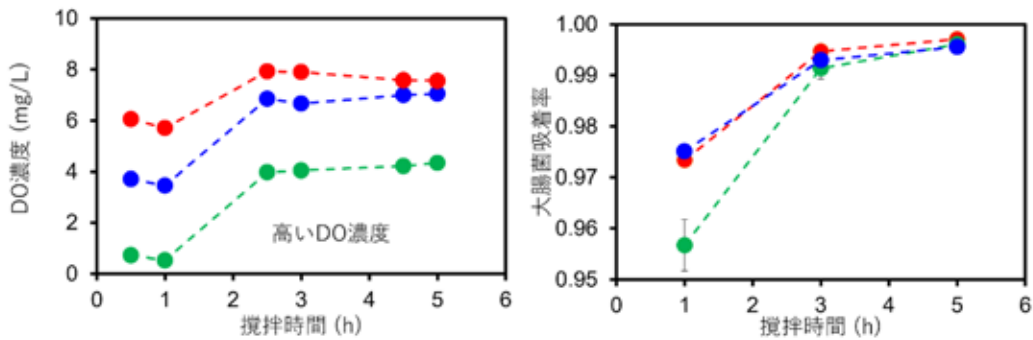


図 3.3 高 DO 濃度条件における DO 濃度と大腸菌吸着率の経時変化
(ここで、●は回転数 150 rpm, G 値 244 /s での結果, ●は回転数 100 rpm,
G 値 147 /s での結果, ●は回転数 50 rpm, G 値 37 /s での結果を表す)

以上の結果から、G 値が 147 /s 以上になるような攪拌が充分になされている場合には DO 濃度が E. coli 吸着に与える影響は小さく、一方で G 値が 37 /s になるような攪拌が充分になされていない場合には DO 濃度が E. coli 吸着に影響を与えることが示唆された。実際の下水処理場の反応タンクでは、曝気により十分な攪拌が起こっていると考えられ、そのような条件では初沈出水中の大腸菌が活性汚泥に接触・吸着する物理的な過程よりも、吸着した BOD や SS 成分を微生物が分解する過程の方が DO 濃度の影響を受けると考えられる。

3.3 実験(3) 活性汚泥劣化実験

新鮮な活性汚泥と劣化した活性汚泥での E. coli 吸着率の経時変化を図 3.4 に示す。

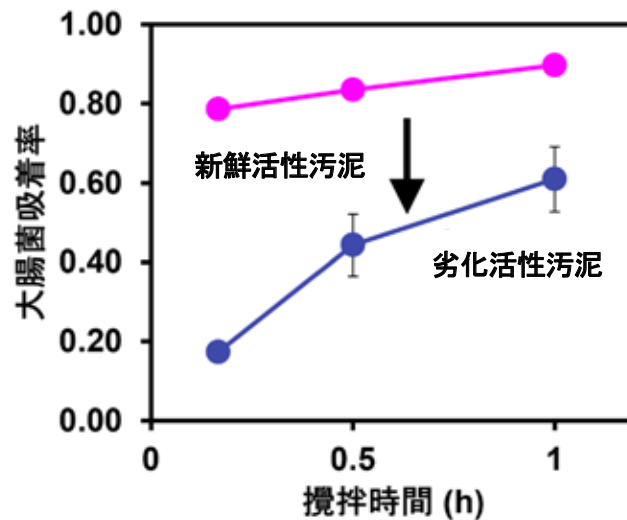


図 3.4 新鮮な活性汚泥と劣化した活性汚泥の大腸菌吸着率の経時変化

新鮮な活性汚泥での大腸菌吸着率は攪拌時間 1 h で 90% に達した。これは、これまでの曝気量、DO 濃度、G 値を変えた実験で攪拌時間 1 h 以上での大腸菌吸着率が 90% 以上であったことと調和的である。一方、劣化した活性汚泥では攪拌時間が 1 h でも大腸菌吸着率が 60% と非常に低い数字となった。しかし、一般的にフロックをくっつける糊の役割を考えると考えられている EPS の量は、LB-EPS、TB-EPS とともに劣化/新鮮によらず有意な差が見られなかった (図 3.5)。EPS 量は、大腸菌吸着に有意な影響を与えていない可能性がある。

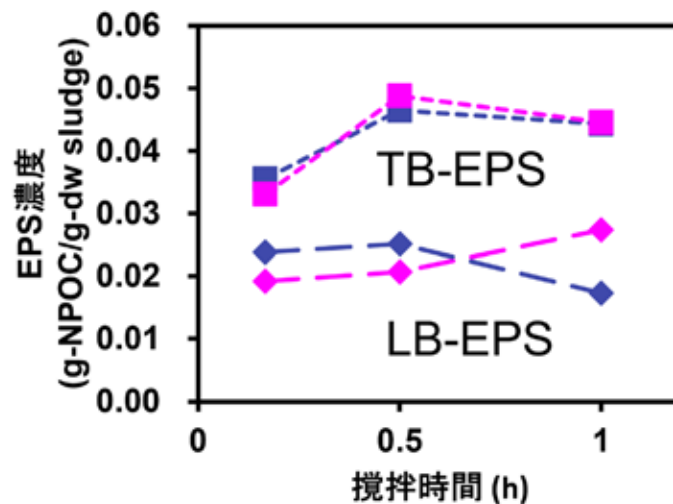


図 3.5 新鮮な活性汚泥と劣化した活性汚泥の大腸菌吸着実験中の EPS 濃度の経時変化

4. 結言

活性汚泥の大腸菌吸着は、攪拌時間が 3 h で定常に達した。G 値が 147 /s 以上になるような攪拌が充分になされている条件では DO 濃度が大腸菌吸着に与える影響は小さく、G 値が 37 /s になるような攪拌が充分になされていない条件では DO 濃度が大腸菌吸着に影響を与えた。新鮮な活性汚泥は 1 h の初沈出水との攪拌混合で大腸菌を 90%以上吸着する一方、24 時間の無曝気連続攪拌により劣化した活性汚泥は 1 h の攪拌混合で大腸菌を 60%しか吸着しなかった。この違いは新鮮/劣化による EPS 量の違いでは説明できなかった。

本研究により、大腸菌吸着能力の低い活性汚泥は、BOD 成分の欠乏した無曝気の攪拌により劣化させることで得ることができると分かった。また、これまでの研究でも、活性汚泥の濃度が小さい場合、おそらく単位量の活性汚泥が吸着できる大腸菌の最大量を超えるため、大腸菌吸着率が低下することが分かっている。このような活性汚泥の条件が実際の下処理場の反応タンクで起こるかどうかが検討する必要があるが、少なくともこれらの条件において大腸菌吸着率を回復させたり、高吸着率を維持したりできるような活性汚泥フロックの高機能化条件を見出すことができれば下水処理効率の維持と処理水質の向上に貢献できると考えられる。

今後は、大腸菌吸着率の異なる活性汚泥での EPS について、全体の EPS 量だけでなく蛋白質量・炭水化物量などの質的な違いにも着目した分析を行う他、大腸菌吸着能力やメカニズムをより理論的に説明できるような物理化学的パラメーター（吸着等温線やフロックの表面電荷、親水/疎水度など）を検討し、大腸菌吸着率の大小に影響を与える要素を絞り込む。さらに、それらの要素を簡単に変化させることのできるような反応タンクの運転条件や添加剤などを検討していきたい。

謝辞

本研究は、2021 年度の公益社団法人 JFE21 世紀財団の技術研究助成により行われました。ここに感謝の意を表します。採水にご協力いただいた自治体ならびに下水処理場職員の皆様に厚く御礼申し上げます。日々の研究において協力いただいた北海道大学大学院工学院の石塚祐介氏、北海道大学工学部技術職員の谷内翔氏、セルスペクト株式会社の平野麗子氏に感謝いたします。

参考文献

- [1] B. Rittmann and P. McCarty (2020) Environmental Biotechnology: Principles and Applications, Second Edition, McGraw-Hill. ISBN-10:1260441601.
- [2] H. Satoh, K. Kikuchi, Y. Katayose, et al.(2020) Simple and reliable enumeration of Escherichia coli concentrations in wastewater samples by measuring β -d-glucuronidase (GUS) activities via a microplate reader. Science of The Total Environment 715, 136928.

- [3] H. Satoh, Y. Katayose, R. Hirano (2021) Simple enumeration of *Escherichia coli* concentrations in river water samples by measuring β -d-glucuronidase activities in a microplate reader. *Water Science & Research* 83. 1399–1406.
- [4] H. Satoh, N. Nagahashi, K. Kikuchi, R. Hirano (2022) Screening Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Wastewater and River Water Using a Novel Simple Phenotypic Antibiotic-Susceptibility Testing Method. *ACS EST Water* 2. 1301–1308.
- [5] X. Y. Li, S. F. Yang (2007) Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Research* 41. 1022–1030.