

## 前処理として超音波照射を行った活性汚泥による 難分解性物質分解能の評価

### Evaluation of Xenobiotic Compound Degradability by Activated Sludge with Cavitation Pretreatment

田中 孝国, 福井 梨紗, 福井 悠太

TAKAKUNI TANAKA, RISA FUKUI and YUTA FUKUI

小山工業高等専門学校物質工学科 〒323-0806 栃木県小山市中久喜 771

TEL: 0285-20-2804 FAX: 0285-20-2880

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

*Division of Material Science and Chemical Engineering, Oyama National College of Technology, 771 Nakakuki, Oyama,  
Tochigi, 323-0806, Japan*

キーワード: 活性汚泥, 超音波, 代謝活性

Key words: activated sludge, cavitations, metabolic activity

(原稿受付 2009年8月6日/原稿受理 2009年9月15日)

#### 1. 緒 言

活性汚泥法は、生活廃水処理法として我が国で最も広く用いられている方法であるが、廃水中に微生物分解を受けにくい難分解性物質が混入すると、活性汚泥中の分解能を持たない多くの微生物種が強い負荷を受け、処理に関連する微生物(群)が死滅することによって廃水の分解時間が増加する(または分解出来ない)問題が残されたままである。現在、難分解性物質を含む廃水の処理効率を上昇させる方法として、化学的・生物学的・物理的方法の追加(補助)が行われている。化学的方法は主に油分を含む廃水に対し、界面活性剤を廃水中へ投与し、難分解性物質を回収する薬品添加操作等<sup>1)</sup>である。この方法は安価・簡便な手法であるが、二次産物による再汚染の危険性が生じる。続いて生物学的方法として、生物添加法(バイオオーギュメンテーション)がある。これは、難分解性物質の分解能力が実験的に確認されている菌株を活性汚泥槽に添加する方法である。この生物添加法は、一時的には強い分解効率の上昇を示すことが知られているが、添加された微生物は活性汚泥に定着できず、ある期間(おおそ1週間程度)を経ると系外へ排出されてしまい、効果が持続出来ないことが報告されている<sup>2,3)</sup>。この場合は、対象となる微生物を追加しない限り、廃水の処理能力が戻りにくいことが複数の研究者や我々の研究によって判明している。三番目の手法である物理的方法は、熱・音波などの物理的操作を伴う補助である<sup>4)</sup>。この方法は機器による作用であるため、簡便であり持続的な効果が期待できる。様々な種類にもかかわらず超音波照射(キャビテーション)は直接的に難分解性物質に作用させる化合物分解処理効果(殺菌効果も

含む)<sup>5)</sup>と間接的に微生物に働きかけて代謝活性の上昇<sup>8,9)</sup>を狙う2種類の効果について報告されている。直接的に作用する方法は、p-クロロフェノールなどの芳香環有機化合物を強い周波数(850 kHz以上)下、約2時間で0.1 mM/Lを完全に超音波照射分解する方法<sup>5)</sup>であるが、この方法は化合物によって超音波照射の条件が異なることから、多種多様の成分を含む廃水にはそのまま適応出来ないと考えられる。

間接的に超音波照射が行われている産業応用例として、アルコール発酵分野における微生物の代謝活性促進といった研究報告例や特許が複数存在する<sup>6,9)</sup>。アルコール発酵の報告例<sup>6)</sup>によれば、まずアルコール発酵槽と発酵槽よりは小さい超音波照射槽の2つの反応槽を用意し、超音波照射槽の下側に超音波振動子(ホーンタイプ)を槽の壁を介して設置して培養液に43 kHz, 1 Wの超音波連続照射を行いながら循環培養を行うと、アルコールの熟成効果と酵母の増殖能やアルコール生成能が促進されると示されている(酵母の発育阻害を示すとされる培養液中の溶存二酸化炭素が超音波によって除外される、酵母細胞内への糖の透過速度促進などが起こると報告されている)。この現象は他の醸造関係(乳酸発酵の促進200 kHz, 連続照射<sup>7)</sup>など)や食品分野(パン発酵の促進47 kHz, 1 W, 連続照射<sup>11)</sup>など)においても同様の報告例があり、超音波照射効果の有効性が示されている。ただし、これらの報告例では微生物種によって超音波照射条件(時間や周波数、照射のタイミングなど)が異なること、微生物に対して明確な作用が不明である、という点が問題として残されている。

環境の分野においても、超音波照射を応用する試みがされている。超音波プローブを汚染湖沼に設置して間欠

照射を行うことで湖沼の浄化を図る特許例<sup>8)</sup>、同じく超音波プローブを設置した反応槽と湖沼廃水や生ゴミを循環・混合させることで浄化を図る特許例<sup>9)</sup>が示されている。この特許例は微弱超音波を与え微生物の増殖を促すとともに、汚染物質の分解を行う方法と紹介されている(超音波照射条件、増殖能や分解能を示すデータは未記載)。

以上のように、超音波照射は化学物質への分解効果と微生物活性上昇の相乗効果が報告されているにも関わらず、この相乗効果を狙った水環境浄化の報告例や応用例が無い(余剰汚泥を超音波で分解・可溶化する研究報告を除く)。そこで本研究では広く用いられている活性汚泥を用い、活性汚泥中の微生物群の代謝活性が、超音波照射でどのように変化するか検討を行った。そして超音波照射を行った活性汚泥を用いて難分解性物質の分解実験を行い、超音波が及ぼす活性汚泥法への影響について評価を行ったので報告する。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 馴養活性汚泥の準備

今回の実験では水処理センター(小山市扶桑水処理センター)から採取した生活廃水用活性汚泥に、グルコースを主炭素源とした模擬家庭用廃水(成分はグルコース 0.4 g/L・ポリペプトン 0.4 g/L・リン酸 1 カリウム 0.02 g/L)<sup>10)</sup>を Fill and Draw 法にて毎日添加し、半年間馴養させた活性汚泥を用いた。実験に供した馴養活性汚泥の MLSS 範囲は約 3,000 ~ 4,000 mg/L である。

### 2.2. 模擬廃水の準備と分解実験

難分解性物質を含む模擬廃水として、トルエン類似体

表 1. モデル廃水 PT 培地の組成

薬品名	分量
<i>m</i> -Toluic acid	0.8 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.47 g
NaHPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	1.47 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.36 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.25 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.07 g
Salt 2 (表 2 参照)	2 mL
蒸留水	1 L

表 2. PT 培地中の Salt2 の組成

薬品名	分量
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.80 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.47 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.47 g
CuCl <sub>2</sub>	1.36 g
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.25 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.07 g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.05 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 mL
蒸留水	100 mL

である *m*-トルイル酸(以下、トルイル酸)を主炭素源とした培地(以下 PT 培地、表 1 及び 2)<sup>3)</sup>を用いた。トルイル酸は微生物のトルエン分解経路の 2 番目の分解物質であること、水溶性であり分光光度計による濃度検量線で定量的な解析が可能、という 2 点から採用した。模擬廃水の分解実験は、馴養活性汚泥の MLSS が約 4,000 [mg/L] になるように PT 培地と 500 mL 三角フラスコに入れて混ぜ、一定量の水を入れた超音波照射装置(超音波洗浄器, YAMATO, BRANSON1200)を用い(図 1)、超音波を 47 kHz, 60 W (広く使用されている超音波洗浄器の条件)の固定条件下、手で緩やかに混ぜながら超音波照射した後に振とう培養(100 rpm, 25°C)を行った。超音波の照射は、培養開始前のみ 0 秒, 10 秒, 30 秒, 60 秒に時間を変化させて行い、振とう培養中は照射を行っていない。実験中は活性汚泥の濃度(MLSS)とトルイル酸濃度を測定した。ただし、活性汚泥によるトルイル酸分解はラグ期が約 24 時間存在するため、24 時間以降を測定対象とした。活性汚泥濃度(MLSS)は乾燥させた活性汚泥の重量を測定した。トルイル酸濃度は、サンプル液を遠心分離(10,000 rpm, 1 分間)し、上澄み液を 0.45 μm のフィルターでろ過後、ろ液を適宜希釈した後、分光光度計(SHIMADZU, UVmini1200)でトルイル酸の吸光度(OD<sub>275</sub>)を測定した。トルイル酸の濃度は以下の(1)式により換算した(R<sup>2</sup>=0.99)。(1)式は、本研究において実験的に求められた換算式である。

$$\text{トルイル酸濃度 [g/L]} = 0.16 \times \text{OD}_{275} \dots \dots \dots (1)$$

### 2.3. 超音波照射を行った活性汚泥の代謝活性評価

超音波照射時間の違いによる活性汚泥の代謝活性を調べるために、酸素消費速度の測定を行った。微生物は有機物を分解する際に酸素を消費するため、その消費速度を測定することによって代謝活性を判断することができる。そのため本研究でも消費速度による評価法を用いて活性汚泥の酸素消費速度を測定した。酸素消費速度の測定の測定方法を以下に示す。まず、活性汚泥とトルイル酸培養液の混合液 100 mL を 10 分間沈殿させた後、上澄み液を別に移して溶存酸素濃度が 5.0 mg/L 以上になるように曝気した。続いて、汚泥を再び戻して迅速に良

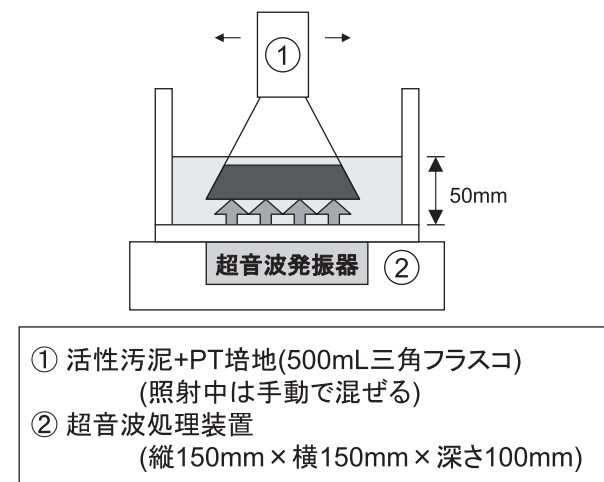


図 1. 超音波照射実験の概略図

く混ぜて 30 mL サイズの容器に満し、ゴム栓に挿入した DO 電極で空気が入らないように密栓した。そして、マグネティックスターラーで十分攪拌を行い、容器内の溶存酸素濃度の経時変化を測定した<sup>12)</sup>。DO 電極には、溶存酸素計 (TOA, TOX-90) を用いた。

2.4. 活性汚泥中のトルエン分解菌への影響の評価

複数種の微生物から構成される活性汚泥のデータと比較するために、単一の微生物への超音波照射の影響を見る必要がある。そこで、活性汚泥中に存在すると考えられるトルエン分解菌のモデル株として *Pseudomonas putida* TN1032 (TOL) についても同様の実験を行い、活性汚泥の結果との比較を行った。使用した *P. putida* TN1032 (TOL) は、トルエン分解能を高めた *P. putida* mt-2 の変異株であり<sup>13)</sup>、12 時間で PT 培地中のトルイル酸を好氣的に分解することが知られている。

3. 結 果

3.1. 超音波が及ぼすトルイル酸への影響

図 2 は PT 培地にのみ超音波を照射した時のトルイル酸濃度の変化である。この結果よりトルイル酸は、今回の超音波照射実験条件下 (47 kHz, 60 W) では、長時間の超音波照射を行っても超音波はトルイル酸濃度に影響を与えないことが判明したため、以後の実験に使用した。

3.2. 滅菌処理を行った超音波活性汚泥でのトルイル酸の分解

微生物以外の物質が超音波の照射を受けて分解作用補助 (触媒作用など) を示す可能性が考えられたため、オートクレーブ (121°C, 20 分) により滅菌処理を行った活性汚泥に超音波 (47 kHz, 60 W) を 60 秒照射し、トルイル酸の分解過程を追った (図 3)。その結果、トルイル酸の分解は見られなかった。3.1 の結果及びこの結果より、以後の報告におけるトルイル酸の分解は、活性汚泥中の微生物 (群) によるものであることが判明した。

3.3. 超音波照射活性汚泥による難分解性物質の分解と増殖への影響

図 4 は、超音波照射時間が異なる活性汚泥で難分解性物質の分解実験を行った時のトルイル酸濃度減少率の経

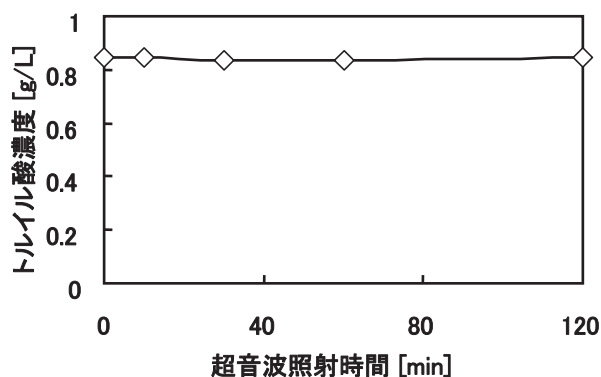


図 2. トルイル酸の超音波による影響

時変化である。図 4 中の縦軸であるトルイル酸減少率は、測定時の濃度を開始時の濃度で割った値である。分解実験を行う際、開始時に準備した新しい培養液濃度が 0.8 g/L 前後で変動することから、定量的に濃度変化を解析するために減少率を用いた。このグラフより、10 秒、30 秒、60 秒の超音波照射を行った場合、照射しないものに比べトルイル酸の分解が早く起こることが判明した。超音波照射時間が 10 秒及び 30 秒の場合、0 秒時と比べると分解が早く起きたが誤差が大きく、有意な差としてのエラーバーの表示が出来なかった。60 秒の照射を行った場合、培養時間 36 時間目までは大きな差は見られなかったが、40 時間から 44 時間の間では 0 秒と比べるとトルイル酸濃度の減少に差が生じた。この間は図中に付与したエラーバーも重ならなかったことから、60 秒超音波を照射することにより、活性汚泥中の微生物 (群) の持つトルイル酸分解特性が上昇したと考えられた。

続いて、トルイル酸分解の効果を判断するために、表 3 に 0 秒及び 60 秒の分解速度の比較を記載した。表 3 に示した分解速度は、0 秒は 24 時間後から 42 時間後、60 秒は 24 時間後から 36 時間後 (60 秒は 4 回の測定時全てでトルイル酸の分解が 36 時間で終了したため) のトルイル酸濃度変化量をそれぞれの経過時間で割った値である。この表から超音波照射 60 秒処理の方が約 2 倍の分解速度を持っていることが判明した。この現象の要因として超音波照射による活性汚泥中の微生物 (群) に

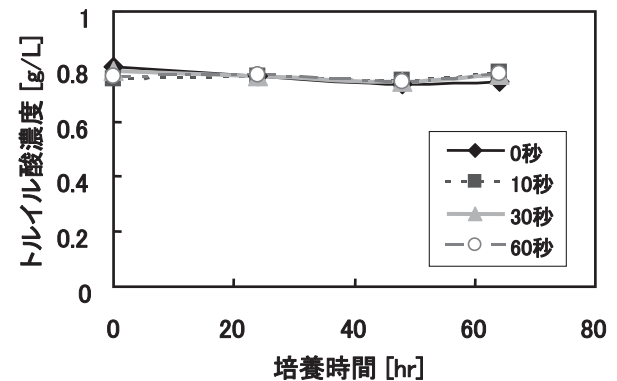


図 3. 滅菌処理を行った活性汚泥でのトルイル酸分解

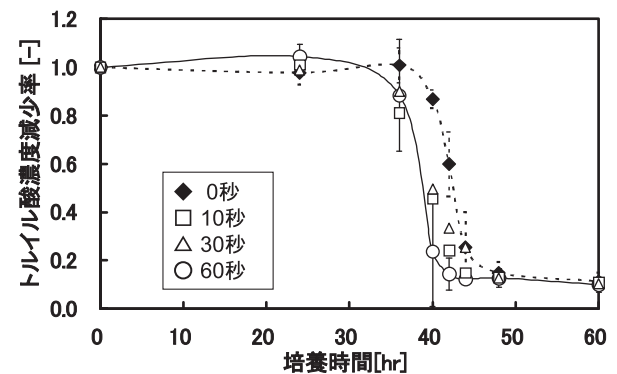


図 4. 超音波照射時間を変化させた時の活性汚泥の分解能への影響 (エラーバーは超音波照射 0, 60 秒照射に付与、サンプル数=4)

表 3. 超音波照射時間の異なる活性汚泥の分解速度の比較 (サンプル数=4)

超音波照射時間 [s]	0	60
分解速度±標準偏差 [ $\times 10^{-2}$ g/L/hr]	2.26±0.38	4.86±1.74

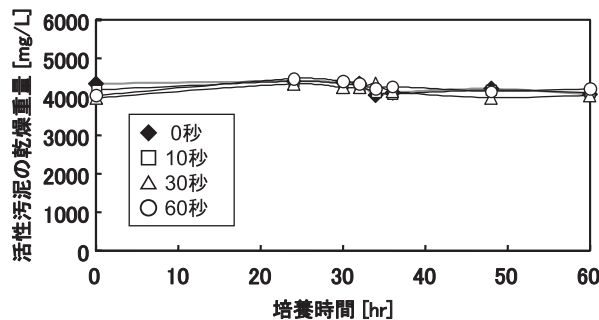


図 5. 超音波照射時間を変化させた時の活性汚泥増殖への影響

トルイール酸が浸透したことによる分解促進及び増殖，代謝活性の上昇が考えられた(3.4. 参照)が，現段階では詳細は不明である。また，120秒以上超音波照射を行った場合も60秒とほぼ同じ分解傾向を示したため，今回の実験は60秒を最大値として進めることとした。

図5は，超音波照射時間の異なる活性汚泥のMLSSの経時変化である。複数回の実験を行ったが，超音波照射の時間に関わらず，活性汚泥の増殖に影響は見られなかった。この結果より，微生物(群)は今回の超音波照射条件では強い増殖能の変化を示さないことが判明した。

### 3.4. 超音波が及ぼす活性汚泥の代謝活性への影響

表4は，超音波照射の有無による活性汚泥の酸素消費速度の比較である。この表及び3.3.の結果より，活性汚泥に超音波を照射すると酸素消費速度(代謝活性)が上昇し，トルイール酸分解が促進するということが示唆された。従って，超音波は活性汚泥中の微生物(群)の代謝活性の上昇に何らかの影響を与えていることが判明した。

### 3.5. 超音波照射活性汚泥の顕微鏡による観察

超音波を液中に照射すると激しく気泡が生じ，その気泡の破壊時に衝撃波を発生する(キャビテーション)ということが判明している。このことから，超音波照射による衝撃波で活性汚泥を構成しているフロックが分散し，活性汚泥のフロック中に取り込まれていた微生物と難分解性物質の接触面積(接触する時間)が増加したことで，代謝活性の上昇が起こった可能性が考えられた。そこで超音波を照射した活性汚泥を顕微鏡( $\times 100$ )により観察を行った。

図6は，超音波照射時間0秒(図4-a)，60秒(図4-b)の活性汚泥の顕微鏡写真である。図4-a及び図4-bより，今回の超音波照射条件では見た目上，活性汚泥の強い分散は起こらず，フロック内に存在している微生物(群)とトルイール酸の接触面積が広がる(トルイール酸を資化する微生物が接触しやすくなる)ことで分解が促進された

表 4. 超音波照射時間の異なる活性汚泥の酸素消費速度の比較 (サンプル数=4)

超音波照射時間 [s]	0	60
酸素消費速度 ±標準偏差 [ $\times 10^{-2}$ g/L/hr]	2.98±0.68	4.95±0.55

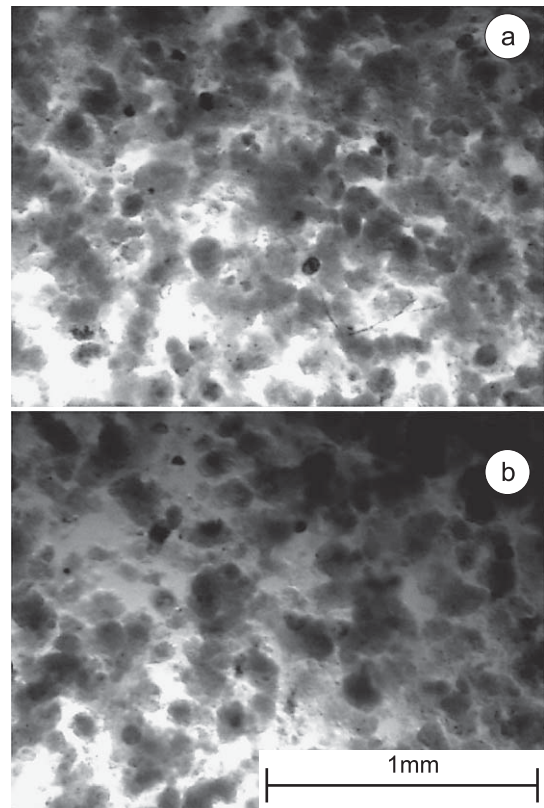


図 6. 活性汚泥の写真  
a: 照射時間0sの活性汚泥  
b: 照射時間60sの活性汚泥

わけではないことが判明した。

### 3.6. 超音波照射 *P. putida* TN1032 (TOL) の難分解性物質の分解特性

超音波を照射した活性汚泥の代謝活性が上昇した要因として，活性汚泥中に存在するとされる土壌由来のトルエン分解菌の活性化が考えられた。

図7は，超音波照射を行ったトルエン分解菌のモデル株 *P. putida* TN1032 (TOL) によるPT培地分解実験を行った時のトルイール酸濃度の経時変化である。図7より超音波照射の有無は，*P. putida* TN1032 (TOL) のトルイール酸分解能に影響していないことが判明した。また，図8のグラフから超音波は *P. putida* TN1032 (TOL) の増殖にも影響を及ぼしていないことが判明した。尚，3分以上連続照射した *P. putida* TN1032 (TOL) は，超音波照射の影響と考えられる殺菌効果を受けてしまい，菌数減少により分解が極端に遅くなる，もしくは分解が出来なくなることが判明した(データは未記載)。

以上の結果より，超音波によって活性汚泥中のトルエン分解菌 *P. putida* TN1032 (TOL) が活性化して，活性

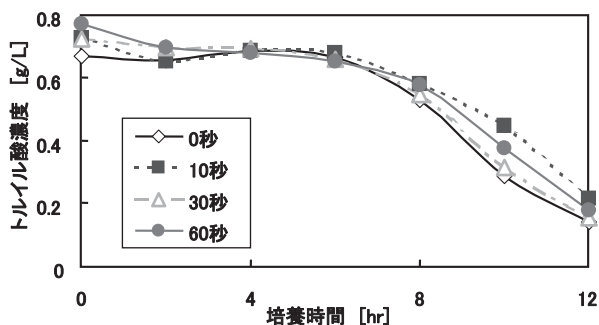


図7. 超音波照射時間の異なる *P. putida* の分解能の比較

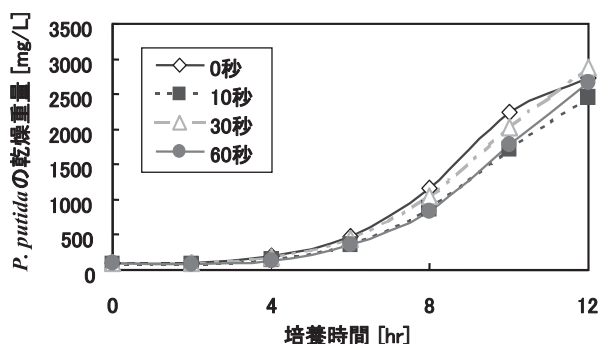


図8. 超音波照射時間の異なる *P. putida* の増殖への影響

汚泥の代謝活性を上昇させているのではないということが示唆された。ただし活性汚泥中には、*P. putida* TN1032 (TOL) 以外にもトルエン分解菌は存在する。そのため、他の菌体でも同様の実験が必要であると考えられた。

#### 4. 結 言

本研究において、難分解性物質分解実験前の短時間(60秒)の超音波照射を行うことによって、活性汚泥の難分解性物質の分解能が上昇することが判明した。トルイル酸への直接的な超音波照射実験及び、活性汚泥中の成分の触媒作用による、トルイル酸分解が起こらなかったことから、難分解性物質分解能の上昇は、活性汚泥中の微生物(群)の代謝活性の上昇によるものだと考えられた。従って、酸素消費速度の測定を行ったところ、培養前の超音波照射によって、活性汚泥中の微生物(群)の代謝活性(分解能)が上昇したことが判明した。しか

し、活性汚泥の難分解性物質分解能及び代謝活性の上昇は、活性汚泥の増殖、活性汚泥フロックの分散とは関連していなかった。続いて、活性汚泥中に存在すると思われる単一微生物のトルエン分解菌のモデル株 *P. putida* TN1032 (TOL) にも超音波照射を行ったが、活性化との関連性は無かった。以上のことから、難分解性物質を処理する際に、処理前に短時間の超音波照射を行うことで、活性汚泥の代謝活性を上昇させることが可能であることは判明したが、その要因に関しては解決出来なかった。今後、間欠的な照射や連続照射、超音波周波数の条件変更、超音波の照射方法(ホーンタイプなど)、トルイル酸で馴養した活性汚泥への超音波照射実験等を行い、超音波照射を行った微生物の環境浄化技術への応用について検討を重ねていきたい。

#### 文 献

- 1) 特開平 08-13638 含油脂廃水の処理方法及びその処理装置.
- 2) 藤田正憲, 池道彦. 2006. 微生物馴養とバイオオーグメンテーション, pp. 18-22. バイオ環境工学. CMC 出版.
- 3) 田中孝国, 福井悠太. 2008. バイオオーグメンテーションを用いた廃水処理技術の検討. 小山高専紀要第 40 号: 103-106.
- 4) Wang, D., M. Sakakibara. 1997. Lactose hydrolysis and  $\beta$ -galactosidase activity in sonicated fermentation with Lactobacillus strains. *Ultraso. Sonochem.* 4: 255-261.
- 5) Teo, C.K., X. Yanrong, Y. Chun. 2001. Sonochemical degradation for toxic halogenated organic compounds. *Ultraso. Sonochem.* 8: 241-246.
- 6) 特開平. 19-42627. 超音波熟成装置.
- 7) 榊原三樹男. 1993. 超音波照射下における微生物の培養—乳酸菌の培養を例として—. *超音波テクノ.* Vol.5, No.10: pp. 23-26.
- 8) 特開平 10-165950. 微弱超音波を用いた湖沼の汚染物質分解装置.
- 9) 特開平 10-155477. 微弱超音波を用いた微生物用汚染物質分解方法.
- 10) Sakai, Y., Y. Nitta, and F. Takahashi. 1994. A submerged filter system consisting of magnetic tubular support media covered with a biofilm fixed by magnetic force. *Water Res.* 28: 1175-1179.
- 11) 伏田矩久, 辰川信行, 松田仁樹, 新井紀男, 架谷昌信. 1993. パン発酵過程における超音波照射の効果. *超音波テクノ.* Vol.5, No.10: pp. 32-35.
- 12) 須藤隆一. 1997. 酸素利用速度・呼吸速度, pp. 172-174. 環境微生物実験法. 講談社.
- 13) Nakazawa, T., Yokota, T. 1977. Isolation of a mutant TOL plasmid with increased activity and transmissibility from *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2. *J. Bacteriol.* 129: 39-46.