

好熱性微生物による有機性汚泥の可溶化

Biocombution of organic sludge by thermophilic bacteria



技術開発本部 第2研究室
長谷川 進
Susumu Hasegawa
三浦 雅彦
Masahiko Miura
桂 健治
Kenji Katsura
技術開発本部 知的財産室
横山 英樹
Hideki Yokoyama

The total biocombustion process (TBP) proposed by Pirt consists of a four-stage biocycle including two thermophilic-mesophilic (T-M) sequences.

Raw sludge is fed into the first bioreactor, where a bacterial culture digests the sludge at high temperature (70~80 °C) and grows.

The output from the first reactor passes into the second reactor, where the organisms from the first reactor are made inactive by a large temperature difference and become the substrate for the organisms living in the second reactor.

After passage through the two T-M sequences, about 80 % of volatile suspended solids (VSS) were dissolved. Bacteria actively secrete protease were isolated from the first thermophilic reactor. It dissolved 25~30 % of the sludge heated at 121 °C in 3 days.

まえがき

現在、有機性廃水のほとんどが生物学的に処理されているといっても過言ではなく、その処理技術の進歩も目ざましいものがあり、廃水処理技術としてはほぼ完成の域に達しているといつてよい。今後、処理水の再利用を目的にさらに高度な処理技術が開発されていくものと考えられる。しかし、廃水中の有機物がどのように処理されたかを考えると、一部は生物により無機ガスに転換されているものの、かなりの部分が生物性汚泥として廃水から分離されている。すなわち、処理水としては有機物の少ない廃水を得る一方で、廃水中の有機物を生物性汚泥に濃縮した形で系外に搬出していることになる。従つて、この系外に搬出される汚泥の処分が適切になされない限り、廃水処理が完全になされたとは言い難い。

これまで、汚泥の処理は、海洋投棄、陸地埋立が主流であったが、1993年のロンドン条約附属書の改訂にもみられるよう、今後、環境保全の目的から海洋投棄についてはますます規制が強化されると考えられる。下水汚泥については、海洋投棄は可能とされてはいるものの「廃棄物の処理は原則として陸上にて行う」という基本的な立場からも、海洋投棄処分量の削減がすすめられると考えられ、事実、EC諸国においては1998年から海洋投棄は全面禁止となる。

わが国では、下水汚泥の処理については「ACEプラン」と題して建設省が取り組んでおり、焼却・溶融して建材として利用する方法 (Construction use)、コンポスト化して緑地に還元する方法 (Agriculture use)、嫌氣的に消化してエネルギーを回収する方法 (Energy use) が検討されている。現状においては、汚泥を集約して焼却・溶融して建材利用する方法が主流となっているが、この方法は、経費がかさむ上、維持管理に熟練を要するため、かなり大規

模な施設でしか実施することは出来ない。今後、下水の普及が進展する都市郊外、農村集落地域では採用し難く、より経済的かつ維持管理の容易な処理技術が望まれている。その様な背景のもと、汚泥のコンポスト化技術が注目を集めているが、処理時間の問題、需要の問題等、解決すべき問題も残されており、採用は限られた範囲にとどまっている。一方、嫌気消化による汚泥の減容化は、創エネルギーということで魅力的な方法であり、汚泥の有効利用と言う立場からも好ましい方法と言えり。また嫌気消化は、維持管理が比較的容易で経済的な方法と言えり。嫌気処理に関する研究は建設省土木研究所が中心となり「バイオフォーカス」と題して産官共同で行われたが、汚泥の可溶化を如何に経済的に行うかがポイントになると結論された。汚泥の可溶化の方法は、酸、アルカリ等の薬品あるいは酵素を添加する方法、超音波、高電圧の印加あるいはミル等で破碎する方法等があるがいずれも運転経費を増すことになり、嫌気消化の経済性を相殺してしまうことになる。

著者らは、汚泥を分解、安定化するコンポスト菌に注目し、活発な発酵段階の高温発酵時の高温部より好熱菌を採取し、好熱菌による汚泥の可溶化を試みた。

本稿では次の略号を使用する。

VSS : Volatile Suspended Solids
揮発性懸濁物質 = 固形有機物を代表する値

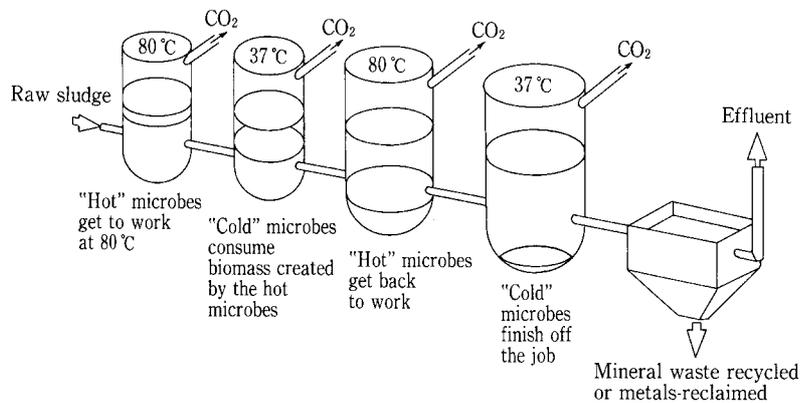
VDS : Volatile Dissolved Solids
揮発性溶解物質 = 溶解性有機物を代表する値

VM : Volatile Matter
揮発性物質、VM = VSS + VDS

vvm : volume / volume / minutes
1分間当たり単位培養液当たりの通気量

1. プロセスの概要

本プロセスの概念は、ロンドン大学キングスカレッジのPirt教授（現、Pirtferm Ltd）により提案された。本プロセスの特長は、70～80℃で活性を有する好熱菌により有機性汚泥を分解・可溶化・ガス化すること、及び、その際、増殖する好熱菌を、37～40℃の中温条件下に曝すことにより不活性化させ、中温菌により消化させることにある。第1図に示すよう、プロセスは2つの高温-中温の繰り返しで構成される。汚泥は第1高温槽（T1）に投入され、ここで、好熱菌により分解・低分子化され一部ガス化される。この際一部好熱菌が増殖する。T1からの流出物は次の第1中温槽（M1）に流入するが、そこで、T1で増殖した好熱菌が急激な温度差によって不活性化し、M1中温菌の基質となる。この2槽で処理を完結することも可能であるが、さらに、高温-中温を繰り返すと、効率が向上し、処理汚泥の沈降性も改善される。処理された汚泥は、沈殿分離され、上澄みは通常の活性汚泥法で仕上げ処理可能である。また、沈殿物はT1に返送され、再度処理される。



第1図 汚泥の生物学的酸化法
Fig. 1 Total Biocombustion Process

2. 実験装置及び実験方法

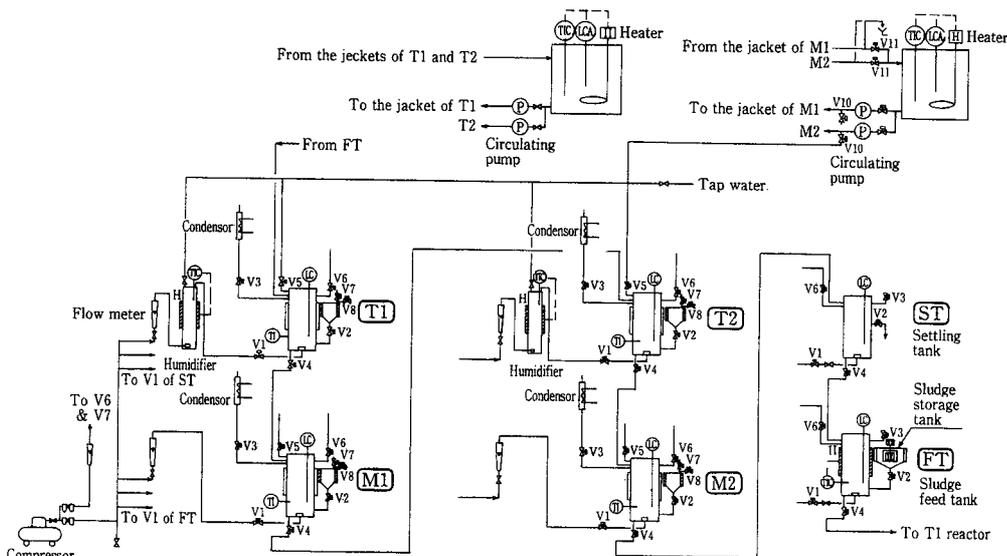
2.1 実験装置

実験装置の概略を第2図に示す。反応槽は直径150 mm、有効容積10 Lの温水ジャケット式円筒型ステンレス製容器を用いた。汚泥の移送は、移送機器類の目詰まりを考慮し、全て空気による圧送とした。

2.2 運送立ち上げ方法

2.2.1 操作条件

操作は回分処理とした。第3図に汚泥投入時の培養液の移送の様子を図示する。各反応槽内の汚泥の10%を種汚泥として種汚泥槽に一時貯留し、残液を後段より順に後続の槽に空気圧で移送する。移送終了後、第1槽に余剰汚泥を40%、最終処理液の沈殿汚泥を返送汚泥として50%投入し、各槽の温度が所定の温度に達した後、種汚泥を戻し培養する。通気量は0.4 vvm、各槽温度は高温槽70～80℃、中温槽35～40℃とした。汚泥の投入から次の汚泥の投入までの時間を1 passage、投入された汚泥が沈殿槽を含めた5槽を通過する時間を1 cycleと定義した。



第2図 実験装置
Fig. 2 Schematic drawing of IOL test equipment

1 cycle = 5 passages

この場合、4槽の滞留時間(HRT)は

$$\begin{aligned} \text{HRT} &= \text{全槽容積} / \text{汚泥投入速度} \\ &= 10 \times 4 / (10 \times 0.4 / \text{passage time}) \\ &= 10 \times \text{passage time} \end{aligned}$$

即ち、1 passageを4日とすると、HRTは40日となる。

2.2.2 運転立ち上げ

Pirt教授が培養する系より各槽100 mlの培養液を分取り、200 ml洗淨瓶に投入して運転を立ち上げた。1 passageを4日として、汚泥の投入及び移送は2.2.1の手順に従い手作業で行った。処理対象汚泥は神戸市玉津処理場より採取した下水処理場余剰汚泥を用いた。

2.2.3 スケールアップ

1 cycle終了毎に各槽の培養液を水道水で2倍に希釈し、同様の回分操作を継続して倍々のスケールアップを実施し、最終的に10 Lにスケールアップした。

2.3 好熱菌の分離及び性能試験

2.3.1 好熱菌の分離

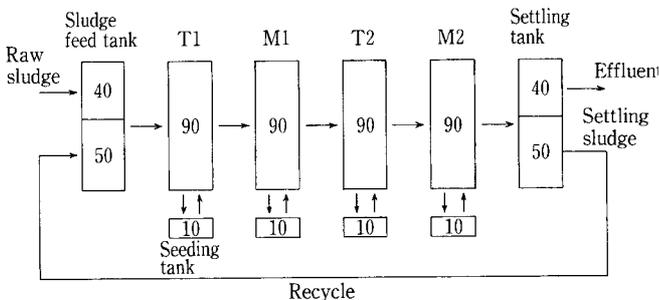
好熱菌の性状を調べるため、高温槽より培養液の一部を採取し、適当に希釈して寒天平板培地上に塗抹した(第4図)。培地には、標準培地、余剰汚泥上澄み、及び後述の滅菌洗淨汚泥を用いた。高温条件では寒天が固化しないため、培養温度は70℃とした。また、寒天の乾燥を防止するため、恒温槽内に水道水を満たしたビーカーを置き加湿した。24時間培養後、特長的なコロニーを全て取り出し、汚泥分解菌を選択した。

2.3.2 滅菌洗淨汚泥

高温反応槽では、温度の影響で汚泥が可溶化することが予想される。そこで、好熱菌の可溶化能を検討する場合は、汚泥をあらかじめ熱処理したものを用いた。汚泥の熱処理法は次のように実施した。

- ① 121℃で15分加圧熱処理(オートクレーブ滅菌)する。
- ② 1000 Gで軽く遠心分離し、上澄みを廃棄する。
- ③ 沈殿汚泥を蒸留水に再懸濁させる。
- ④ ②③の洗淨操作を3回繰り返す。

熱処理汚泥をその処理方法より滅菌洗淨汚泥と称す



第3図 回分処理における汚泥移送模式図

Fig. 3 Procedure of sludge transportation in batch system

る。

2.3.3 可溶化試験

200 ml三角フラスコに供試汚泥100 mlを投入し、容積比で5%の好熱菌培養液を接種した。所定の温度で約60 rpmで振とう培養し、培養後、水道水で100 mlにメスアップし、VSSを測定した。可溶化率は次式で評価した。

$$\{ (\text{培養前 VSS} - \text{培養後 VSS}) / \text{培養前 VSS} \} \times 100(\%)$$

2.4 分析

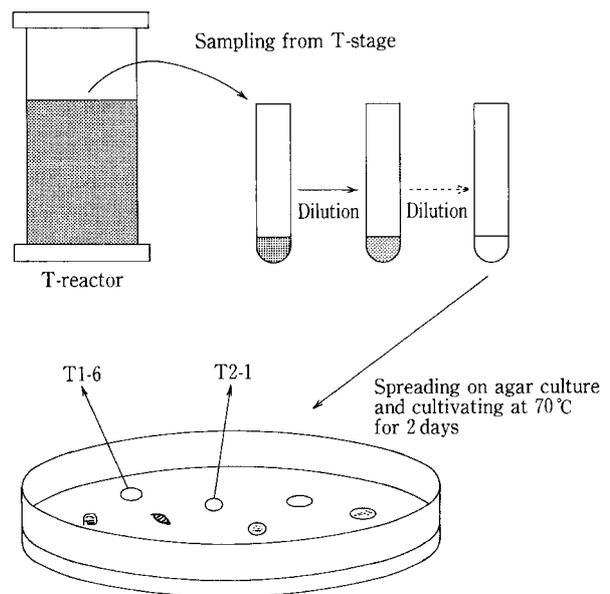
汚泥の組成分析は、衛生試験法・注解を参考に、粗蛋白は有機態窒素よりの換算により、また、炭水化物はSomogy法、粗脂肪はエタノール抽出法によった。

プロテアーゼ活性の測定は、Bomioら¹⁾の方法によった。その他の分析は下水試験法に準じた。

3. 実験結果

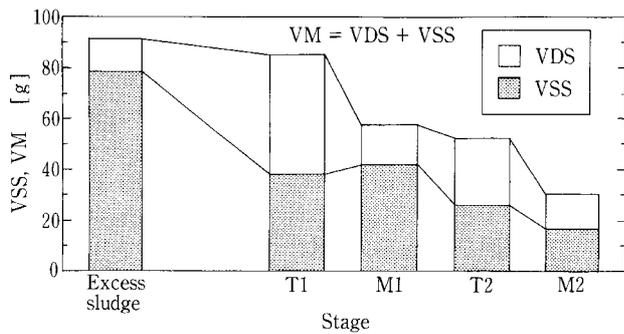
3.1 回分培養試験

HRTを20日として、6 cycles運転した時のVSS及びVMの除去過程を第5図に示す。T1でVSSが半減され可溶化が進行していることが分かる。しかし、VMの除去が小さいことから、T1では有機物のガス化よりむしろ有機性固有用の可溶化が主に進行していると推察された。一方、次のM1では、VDSが大きく減少しており、T1で可溶化された可溶化物質のガス化が進行していると考えられた。また、その際、中温菌が増殖すると推察され見かけ上VSSが増加する現象が認められた。高温第2槽(T2)、中温第2槽(M2)でもそれぞれ同様の傾向が認められるが、M2はM1と異なり、VSSも減少した。これは、M2になると負荷が低下しているため、自己酸化の状態になっていたため汚泥が自己酸化を起こし減少したものと推察される。

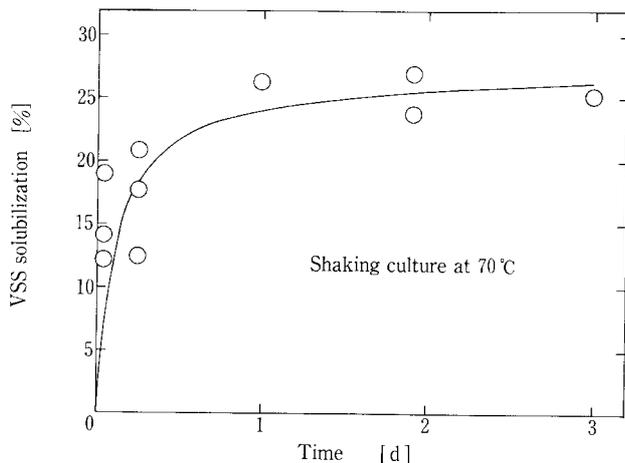


第4図 好熱菌の分離

Fig. 4 Method of isolating for thermophile



第5図 回分処理による余剰汚泥の分解
Fig. 5 Change of VSS and VM



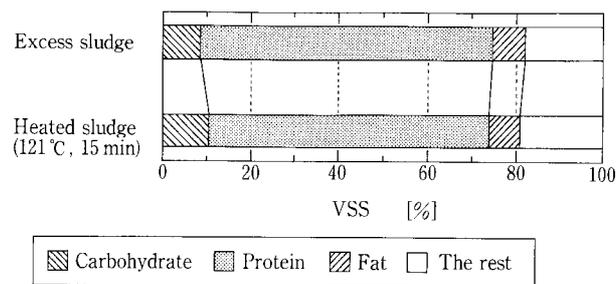
第6図 熱による余剰汚泥の可溶化
Fig. 6 The critical solubilization of excess sludge by heating

3.2 熱による汚泥の可溶化

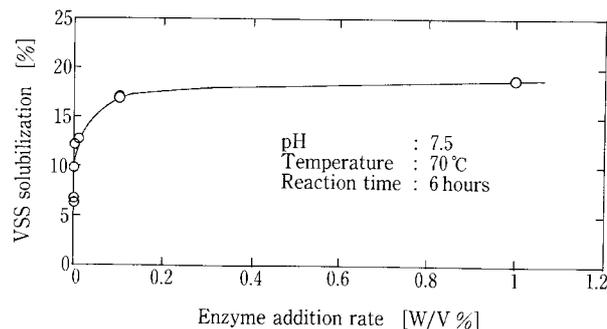
李²⁾は、下水処理場余剰活性汚泥の熱による可溶化を検討し、30分程度の短時間で汚泥が20~30%可溶化することを報告している。著者らも、200 mlバイアル瓶に汚泥を満し、70°C恒温槽中で60 rpmで振とうした結果、第6図に示すよう約1時間で20~25%が可溶化する結果を得た。従って、好熱菌による汚泥の可溶化を検討する場合は、この熱分解による影響を除くため、滅菌洗浄した汚泥を用いた。

3.3 市販酵素による汚泥の可溶化

下水余剰汚泥の組成の分析結果を第7図に示す。主成分は蛋白質でVSSの約60%を占めていた。炭水化物、粗脂肪はそれぞれ10%未満であった。この組成は、滅菌洗浄汚泥についてもほぼ同様であった。このことから、蛋白質の分解が汚泥の可溶化に大きく影響すると考えられる。そこで、市販の蛋白質分解酵素で耐熱性プロテアーゼである和光純薬工業(株)製サモアーゼPC10を用い汚泥の可溶化を試みた。温度及びpHは、サモアーゼPC10の最適条件である70°C、7.5に調整し、反応時間は6時間とした。第8図に滅菌洗浄汚泥の可溶化率に及ぼすプロテアーゼ添加率の影響を示す。添加率0.1%までは、添加率により可溶化率も大きくなるが、0.1%以上では可溶化率はほぼ一定



第7図 余剰汚泥の組成
Fig. 7 Composition of sewage excess sludge



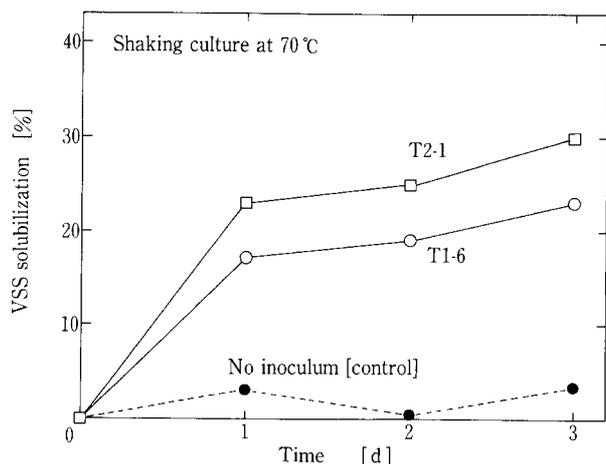
第8図 VSS可溶化率に及ぼす市販酵素添加量の影響
Fig. 8 Effect of enzyme addition rate on VSS solubilization

で、最大可溶率は約20%であった。その他の酵素についても検討したが、リパーゼ、 α -アミラーゼでプロテアーゼと同程度の可溶化率が認められたが、リゾチーム、セルラーゼではほとんど可溶化されなかった。

3.4 好熱菌による汚泥の分解

汚泥がプロテアーゼ及びアミラーゼで比較的分解されたことから、好熱菌のうちプロテアーゼ及びアミラーゼ活性の高い株を汚泥可溶化好熱菌として選び、滅菌洗浄汚泥の可溶化を検討した。好熱菌の分離培地には、標準培地、汚泥上澄み及び滅菌洗浄汚泥を寒天で固めた平板培地を用いたが、コロニー形成数は標準培地で最も多く、滅菌洗浄汚泥ではほとんど形成されなかった。このことから、好熱菌は溶解性有機物がある程度存在しなければ増殖出来ないことが示唆された。外観による観察ではあるが、滅菌洗浄汚泥及び汚泥上澄み寒天培地上で確認されたコロニーは標準培地上でも確認されたことから、汚泥可溶化好熱菌は、標準培地寒天上に形成されたコロニーから選択した。プロテアーゼの分泌の確認は、微量栄養素を含む寒天平板培地にスキนมilkを添加して、目的の微生物を70°Cで24時間培養し、コロニー周辺にスキนมilkの溶解斑の認められたものをプロテアーゼ陽性とした。アミラーゼについても同様に、寒天培地にでんぷん及びヨード液を添加して青色を発色させ、目的微生物を培養し、でんぷんの分解により、コロニー周辺に脱色斑の出来たものをアミラーゼ陽性とした。

好熱菌のほとんどはアミラーゼ陽性を示し、プロテアーゼ陽性の好熱菌もすべてアミラーゼ陽性であった。プロテ



第9図 好熱菌による熱処理余剰汚泥の可溶化
Fig. 9 Solubilization of heated sludge by thermophilic bacteria named T1-6 and T2-1

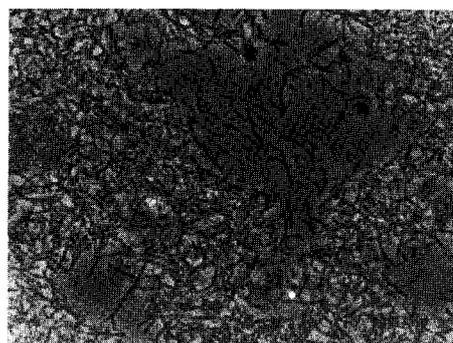
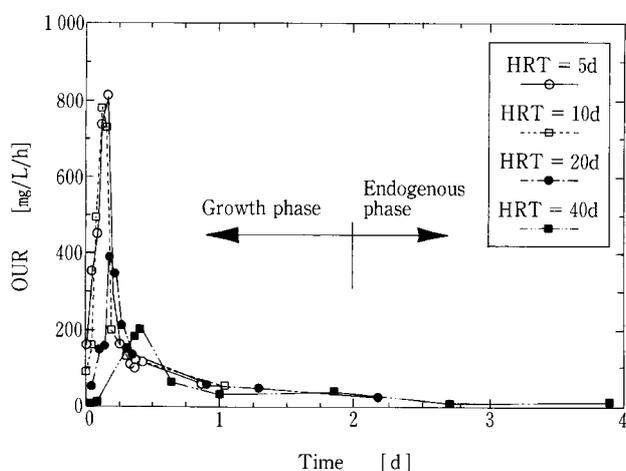


写真 1 汚泥可溶化好熱菌 (T2-1 株)
Photo. 1 Photograph of T2-1



第10図 中温菌(M1)の酸素消費速度
Fig. 10 Oxygen utilizing rate in M1 reactor

第 1 表 好熱菌の菌体収率

Table 1 Yield coefficient (Yc) of thermophilic bacteria

Substrates	Yc (-)
Supernatant of waste starch	0.50
Supernatant of sewage excess sludge	0.48
Yeast-Peptide	0.22

アーゼ以外にも複数の酵素を生成していることを示唆している。本研究で分離した好熱菌では T2-1 株が最もよく汚泥を可溶化した。

熱分解の結果と併せると、熱による分解と汚泥可溶化好熱菌による分解とにより余剰汚泥の VSS は45~55%分解されることになり、回分試験における T1 槽での結果とよく一致した。

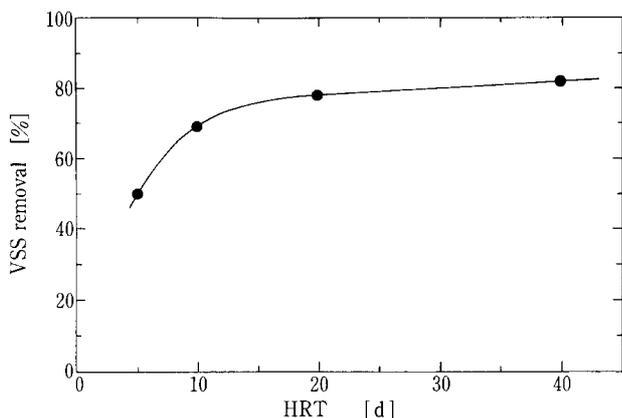
3. 5 中温槽における反応

前述のように、中温槽では、高温槽で可溶化された有機物のガス化が行われる。M1 における酸素消費速度の測定結果を第10図に示す。酸素消費速度は培養開始後急速に上昇し、約5時間でピークに達し、その後急激に減少した。この時、最大酸素消費速度は19.2 kgO₂/m³/dであった。このことから生物分解性の溶解性有機物の分解が非常に速い速度で進行していることが分かる。また、その際、中温菌が増殖するため、一時的に VSS の上昇が確認される。参考として、種々の基質に対する T2-1 株の汚泥転換率を第1表にまとめる。比較的分解の容易な有機物を基質とした場合は、ガス化が容易に進行するため汚泥転換率は低い値を示すが、汚泥上澄液では約50%と大きい値になっている。第1表の結果より、M1 槽で除去された VM の約50%が汚泥に転換していると仮定すると、汚泥の増殖を減じた実際の可溶化率は約5%と推算され、中温槽においても多少なりとも可溶化が進行していると推察される。一方、M2 槽においては、前槽において分解の容易な有機物はほとんど除去されていると考えられ、酸素消費速度も小さい値となっていた。そのため、自己酸化状態になっていると推察され、結果的に汚泥は減少している。

アーゼ陽性菌の中には、時折、プロテアーゼ活性を示さないこともあった。これは、その菌にとって、温度、pH等の培養条件が最適条件から微妙に外れていたためと考えられる。本研究では、70°Cでプロテアーゼを安定して分泌する2株(T2-1, T1-6株)を分離した。T2-1株の顕微鏡写真を写真1に示す。

分離した好熱菌の汚泥可溶化能を確認するため、滅菌洗浄汚泥の10倍希釈液を寒天で固め、分離菌を塗抹し、70°Cで培養した。24時間の培養でコロニーが形成され、コロニー周辺に可溶化斑が認められたことから、これらの好熱菌が汚泥可溶化能を有することが確認された。

さらに懸濁系での汚泥の可溶化能を調べるため、分離した汚泥可溶化好熱菌を滅菌汚泥上澄み液で1昼夜前培養し、滅菌洗浄汚泥95 mlに前培養液5 mlを添加した。対照には、オートクレーブ滅菌した前培養液を添加した。培養は70°C恒温槽中で60 rpmで振とう培養した。結果を第9図に示す。対照区ではほとんど汚泥の可溶化が認められなかったが、汚泥可溶化好熱菌を添加した系では、滅菌洗浄汚泥の VSS をさらに20~30%可溶化した。これは、市販の何れの酵素よりも高い分解率で、汚泥可溶化好熱菌がプロテ



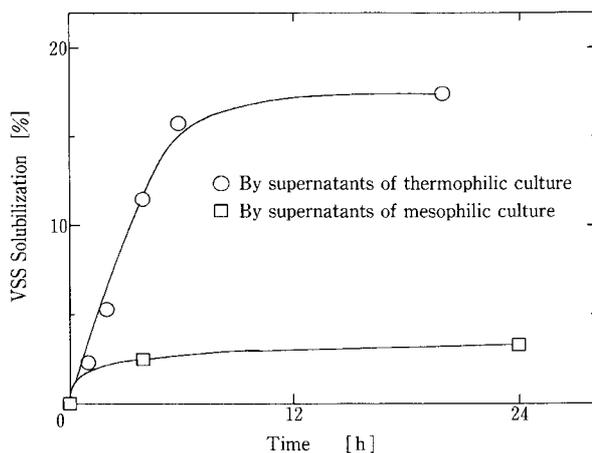
第11図 HRT と VSS 除去率の関係 (連続処理系)
Fig.11 VSS removal at various HRT with continuous flow system

3.6 連続処理実験

これまでの実験は回分操作で Pirt の手順を踏襲したものであったが、実装置においては、連続処理の方が設備も簡単で、維持管理も容易である。そこで、実験室レベルで連続処理の可否を検討した。汚泥の投入はチューブポンプにより連続供給としたが、実際には、汚泥投入量が小さいため、10分間に1分起動の間欠注入となった。また、後段への汚泥の移送は自然流下とした。滞留時間を変化させた場合の VSS 除去率を第11図に示す。滞留時間を長くすると VSS 除去率が上昇する傾向にあるが、滞留時間が20日以上では除去率は約80%でほぼ一定となり、それ以上の可溶化は期待出来なかった。このことから、生物的に分解出来る有機性汚泥の上限は約80%程度であると推察された。HRT を短縮すると可溶化率は低下する傾向にあるが、それでも、HRT 5日 で VSS の約50%を可溶化することができ、これは従来の嫌気性消化法の約4分の1の日数であることから汚泥減容化の有効な方法になり得ると評価出来る。

3.7 好熱菌上澄液による汚泥の可溶化

汚泥は固形物、言い換えれば高分子性物質であり、口の微生物ではそのまま資化することは出来ない。微生物がこのような高分子性有機物を資化するには、まず、高分子物質を微生物に吸収可能な低分子物質にまで分解する必要がある。そのため、通常、高分子物質資化微生物は、体外に種々の酵素を分泌し、固形物を低分子化して体内に吸収する。そこで、好熱菌による有機性固形物の可溶化が、好熱菌の出す体外酵素によるものと仮定し、好熱菌の培養液の上澄みによる滅菌洗浄汚泥の可溶化を試みた。上澄みの分離は、連続処理系の T1 培養液を18 000 Gで15分間高速遠心して行った。滅菌洗浄汚泥と上澄み液を等容積で混合し、70℃恒温槽で振とうした。結果を第12図に示す。対照区には、同じ連続処理系の M1 培養液上澄みを用いた。M1 上澄み液でほとんど可溶化されなかったが、T1 培養液すなわち汚泥可溶化好熱菌を含む培養液の上澄みでは15~20%の可溶化が認められ、好熱菌が汚泥可溶化酵素を生成していることが確認された。この上澄み酵素液のプロテアーゼ活性を測定したところ、前述のサモアーゼ PC 10



第12図 培養液上澄みによる熱処理汚泥の分解
Fig.12 VSS solubilization by the supernatants of thermophilic and mesophilic culture

の0.1%酵素液の200分の1程度しかなかった。にもかかわらず滅菌洗浄汚泥を同程度可溶化したことから、プロテアーゼ以外の酵素も汚泥の可溶化にかなり影響していると推察された。

むすび

自然界に存在するあらゆる有機物は微生物によって分解されるといってもよい。そうでなければ、その物質がどんどん蓄積され地球がその物質で埋め尽くされることになる。現在、汚泥減容化は、脱水、焼却といった物理化学的方法が主流となっているが、これらは、経済面、維持管理面で問題があるため最善の方法とはいえない。本稿で紹介したプロセスは生物学的に汚泥を減容化することから、環境面、経済面、維持管理面からも最良の方法と考えられる。本法は好熱菌を用いるため維持管理に特別な技術を要するようと思われるが、反面、好熱菌を用いると次のような利点が考えられる。

- ① 高温に生存出来る生物種は限られているためコンタミを起しにくい。
→運転立ち上げ及び好熱菌の維持培養が容易
- ② 好熱菌の代表種は体外酵素を分泌する。
→培養液自体が可溶化能を持つ=効率が良い
- ③ 好熱菌の生成する酵素は耐熱性。
→可溶化酵素の活性は温度が高いほど高い。

水処理技術が物理化学的な方法から生物学的方法に発展してきたように、汚泥処理技術においても現在の物理化学的方法から生物学的方法に発展していくことが期待される。

本研究は Pirtferm Ltd との共同研究によるものである。

【参考文献】

- 1) Bomio, M., Sonnleitner, M., Fiechter, A.: Growth and biocatalytic activities of aerobic thermophilic populations in sewage sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 356-362 (1989).
- 2) 李玉友: 嫌気性消化における下水汚泥の分解機能に関する研究, 学位論文, (1989).