

---

余剰汚泥脱水ケーキの細胞破壊処理ならびに  
固体培養による二次代謝産物の生産

---

15360482

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 山 際 和 明

新潟大学自然科学系教授

## はしがき

活性汚泥法に代表される好氣的生物学的廃水処理操作は家庭下水から工場廃水に至るまで幅広く適用されている。生物学的廃水処理操作では微生物による浄化活動に伴って余剰汚泥が必然的に発生し、その余剰汚泥の処理、処分が大きな問題として残っている。余剰汚泥の処分量を減らす為には、余剰汚泥の持つ有機質としてのエネルギーをできる限りカスケード的に利用することが必要である。本研究は、余剰汚泥を有機質資源としてバイオ殺虫剤など二次代謝産物の生産に利用するプロセスを開発するためのものである。

この研究報告書は、平成15～17年度科学研究費補助金：基盤研究（B）（課題番号15360482）の援助により、「余剰汚泥脱水ケーキの細胞破碎処理ならびに固体培養による二次代謝産物の生産」に関する研究をまとめたものである。

なお、本研究課題に関する研究組織及び研究経費は以下の通りである。

### 研究組織

研究代表者：山際 和明（新潟大学工学部教授）

### 交付決定額（配布額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	5,600,000	0	5,600,000
平成16年度	1,200,000	0	1,200,000
平成17年度	1,400,000	0	1,400,000
総計	8,200,000	0	8,200,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. A. Kawaguchi, M. Yoshida, K. Yamagiwa, A. Ohkawa

”Mechanical Disintegration Methods for Utilization of Excess Activated Sludge as Microbial Substrate”

The Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering , 1P-06-026, pp. 1-10

October 17-21, 2004, Kitakyusyu , Japan

2. K. Yamagiwa, A. Kawaguchi, Y. Endoh, T. Naruse, M. Yoshida, A. Ohkawa

“Mechanical Pretreatment of Excess Sludge for Production of Biopesticide by *Bacillus thuringiensis*”

The 1st IWA-ASPIRE Congress, pp. 1-6

July 10-15, Singapore, Singapore

### (2) 口頭発表

1. 川口亜季子、徐建玲、吉田雅典、山際和明、大川輝：

「余剰汚泥の可溶化を目的とした機械的処理方法の検討」

化学工学会群馬大会研究発表講演要旨集,p107, 2003年7月14日,15日

2. 川口亜季子、青山達也、吉田雅典、山際和明、大川輝：

「汚泥ケーキを対象とした細胞壁破碎処理方法の検討」

化学工学会秋田大会研究発表講演要旨集,D101, 2004年7月22日,23日

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、*Bacillus thuringiensis* の培養などに関して新潟大学大学院自然科学研究科堀 秀隆教授に多大なご助言、ご協力を頂いた。また、装置の製作や実験データの取得、解析などに関して下記の諸君（敬称略）より多大なご協力を頂いた。また、彼らとのディスカッションを通して研究の方向性を修正しながら多くの成果をあげることができた。ここに記して心から御礼を申し上げる。

川口 亜季子（平成 16 年度 新潟大学大学院博士前期課程修了）

青山 達也（平成 15 年度 新潟大学工学部化学システム工学科卒業）

遠藤 由佳（平成 16 年度 新潟大学工学部化学システム工学科卒業）

成瀬 辰郎（平成 16 年度 新潟大学工学部化学システム工学科卒業）

小林 太一（平成 17 年度 新潟大学工学部化学システム工学科）

外館 隼一（平成 17 年度 新潟大学工学部化学システム工学科）

南雲 信宏（平成 17 年度 新潟大学工学部化学システム工学科）

## 目次

第1章 緒論	1
1-1 余剰汚泥の発生	1
1-2 余剰汚泥の利用方法	1
1-3 汚泥の前処理	4
1-4 バイオ殺虫剤	5
第2章 余剰汚泥スラリーを対象とした細胞壁破碎処理の効果	7
2-1 緒言	7
2-2 実験装置と方法	9
(1) 汚泥試料	9
(2) 凍結融解処理	9
(3) 気泡析出処理	9
(4) 超音波処理	9
(5) 過酸化水素処理	9
(6) オゾン処理	10
(7) オートクレーブ処理	10
(8) 分析方法	10
2-3 実験結果と考察	11
(1) 可溶化率と汚泥削減率	11
(2) 凍結融解処理	12
(3) 気泡析出処理	13
(4) 超音波処理	15
(5) 過酸化水素処理	16
(6) オゾン処理	17
(7) 可溶化エネルギー効率	19
2-4 まとめ	24
第3章 汚泥脱水ケーキを対象とした細胞壁破碎処理の効果	25
3-1 緒言	25
3-2 実験装置と方法	26
(1) 試料	26
(2) 凍結融解処理	27

(3) 気泡析出処理	27
(4) 過酸化水素処理	27
(5) オゾン処理	27
(6) オートクレーブ処理	28
(7) 分析方法	28
3-3 実験結果と考察	29
(1) 可溶化率	29
(2) 凍結融解処理	29
(3) 気泡析出処理	30
(4) 過酸化水素処理	33
(5) オゾン処理	33
(6) オートクレーブ処理	34
(7) 可溶化率に及ぼす含水率の影響	34
3-4 まとめ	37
第4章 余剰汚泥スラリーを基質としたバイオ殺虫剤の生産	38
4-1 緒言	38
4-2 実験方法	39
(1) 菌株	39
(2) 余剰汚泥スラリー	39
(3) 可溶化前処理	39
(4) 菌の計数方法	39
(5) 培養方法	40
4-3 実験結果と考察	42
(1) 振盪培養における Bt 菌の増殖	42
(2) 余剰汚泥スラリーを用いた Bt 菌の培養	43
中部下水処理場の汚泥スラリーを用いた場合	43
船見下水処理場の汚泥スラリーを用いた場合	44
4-4 まとめ	48

第5章 汚泥脱水ケーキをを基質としたバイオ殺虫剤の生産	49
5-1 緒言	49
5-2 実験方法	50
(1) 菌株	50
(2) 汚泥脱水ケーキ	50
(3) 前処理	50
(4) 培養方法	51
(5) 分析方法	51
5-3 実験結果と考察	52
(1) 中部下水処理場の脱水ケーキを用いた場合	52
(2) 船見下水処理場の脱水ケーキを用いた場合	54
5-4 まとめ	57
第6章 総括	58
参考文献	61

## 第1章 緒言

### 1-1 余剰汚泥の発生

生物学的廃水処理操作は、廃水中に溶解している有機汚濁物質を微生物が分解・除去する作用を利用している。この過程において、有機汚濁物質は異化代謝経路によるエネルギー生成と同化代謝経路による菌体合成に用いられる。つまり、生物学的廃水処理では、有機汚濁物質は異化代謝経路により二酸化炭素まで酸化分解されるほか、同化代謝経路により細胞構成成分を経て菌体合成に用いられる。従って、生物学的廃水処理操作では増殖菌体すなわち余剰汚泥が必然的に発生する。例えば、標準活性汚泥法における余剰汚泥の発生量は0.5 kg-MLSS/kg-BOD程度であると言われている。すなわち、処理したBOD量の約半分が余剰汚泥として排出される。標準活性汚泥法では、汚泥処理までを含めると全処理コストの中で汚泥処理費用の占める割合が最も大きい。余剰汚泥の処理方法としては、脱水後に焼却し、焼却灰を埋め立てる方法が最も広く採用されている。しかし、日本全体で最終処分地の残余容量が少なく、埋め立て処分する量そのものを削減することが日本の環境行政上急務の課題となっている。

余剰汚泥の最も一般的な中間処理方法は焼却である。焼却灰の減容化を図る方法として溶融してスラグ化する方法があるが、エネルギーコストが高い。また、焼却灰を原料としたレンガの製造も試みられたが、レンガの製造コストが高いために再利用量が少ない。余剰汚泥に由来する最終処分地埋め立て量を削減する方策として、余剰汚泥を有機資源として再利用する方法が挙げられる。汚泥の再利用を行った場合でも、残滓が発生すればその焼却灰を埋め立てる必要がある。しかし、余剰汚泥を有機質資源としてカスケード利用することにより最終的に埋め立て処分される量が削減できると期待される。すなわち、余剰汚泥の削減を図るためには、余剰汚泥を有機質資源として再利用する新しい方法を検討する必要がある。

### 1-2 余剰汚泥の利用方法

余剰汚泥を有機質資源として、つまり微生物反応の基質として利用する代表的な方法として、コンポスト（堆肥化）やメタン発酵が挙げられる。

コンポストは、脱水汚泥を基質として固体培養を行い、有機物を好氣的に酸化分解して無機化し、残存する窒素やリンを肥料として利用する方法である。コンポストは農耕地に施用されるために埋め立て処分地の延命化には効果がある。しかし、コンポストを

必要とする農耕地に対してコンポストが過剰に生産されていること、下水由来のコンポストでは重金属による汚染やプラスチック・金属片が混入する問題が残っているため、下水汚泥を原料としたコンポストではその需要が限られているのが現状である。

汚泥を基質としたメタン発酵ではエネルギーの回収が可能である。しかし、処理速度が遅いため反応器容積が大きくなるほか、発生したガス中に含まれる二酸化炭素や硫化水素の除去などに設備が必要となるため、エネルギー回収を目的としたメタン発酵は比較的規模の大きな場合に限られる。また、多くの下水処理場では余剰汚泥の減量化を目的として嫌気消化を行っている場合が多い。しかし、発生したメタンを利用して発電を行っている施設は少なく、多くの処理施設では消化槽の加温用に利用されているにすぎない。なお、余剰汚泥など有機物質を基質としてメタン発酵した場合、有機物質を構成している窒素、リンは消化液中に高濃度で残存するため、メタン発酵後の液ならびに

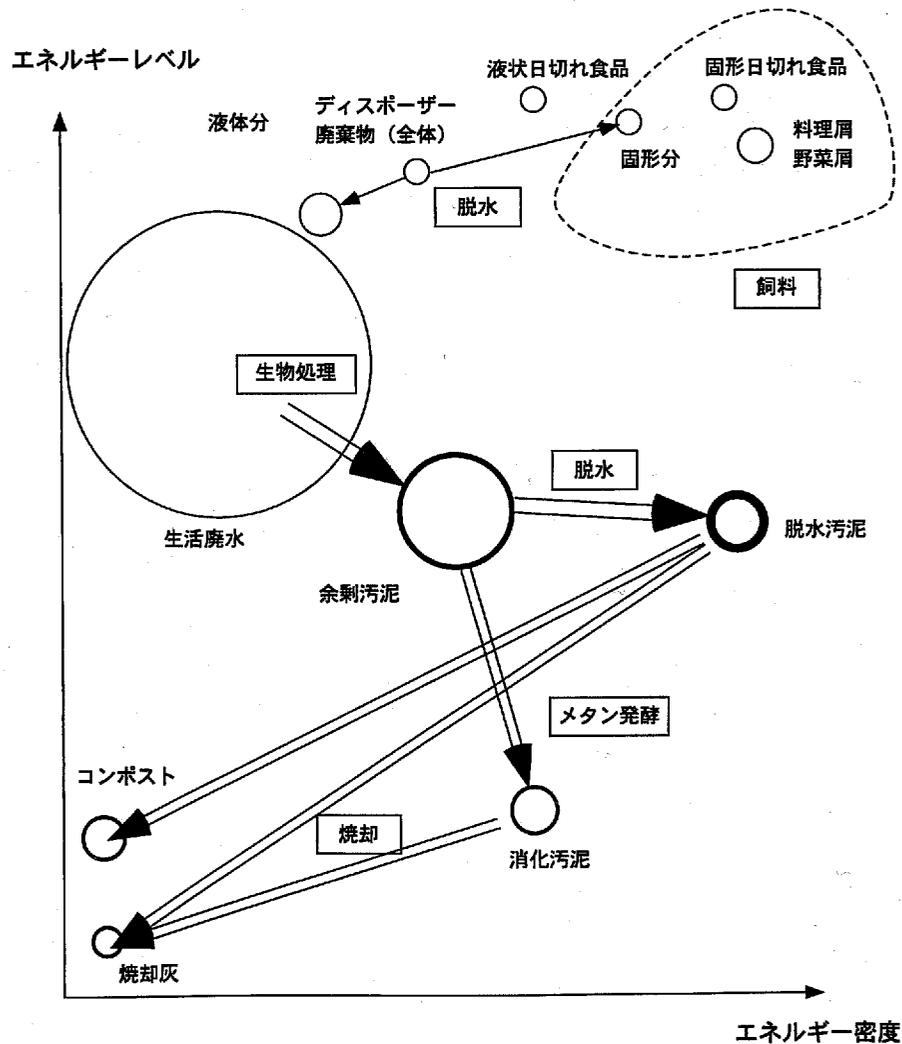


図1 有機性廃棄物のエネルギー

残滓の処理が必要となる。

コンポストでは汚泥中のC、Hを無機化して除去し、残存する窒素とリンを利用する。逆にメタン発酵では、C、Hを利用し、窒素とリンは廃棄される。余剰汚泥の持つ有機物質としてのポテンシャルを有効に利用する方法として、余剰汚泥を他の微生物培養基質として用いる方法が挙げられる。そのような微生物培養の例として、*Bacillus subtilis* による抗菌性ペプチド iturin やバイオ界面活性剤の生産、*Bacillus thuringiensis* によるバイオ殺虫剤の生産などが検討されている。

微生物が利用する際に利用できるエネルギーの質（エネルギーレベル）と有機物濃度（エネルギー密度）の関係を利用して有機性廃棄物の量と質を図1にまとめる。家庭から排出される有機性廃棄物は資化性に富み、有機物濃度も高い。廃水は下水として集められ処理されるが、大量の水で希釈されているため廃水のエネルギー密度は低い。活性汚泥プロセスでは、流入した廃水が処理水と余剰汚泥の形で系外に排出される。つまり、生物学的廃水処理は、有機物濃度が希薄で水量の多い廃水を濃度数%の活性汚泥微生物（余剰汚泥スラリー）に変換する方法である。余剰汚泥スラリーは固形分濃度が数%程度まで濃縮されているため、活性汚泥混合液に比べればエネルギー密度ははるかに高い。余剰汚泥スラリーは液状であるため輸送や混合などが容易に行える。このため、液体培養を行うことにより余剰汚泥を再利用するための処理プロセスを構築することは比較的容易である。しかし、多くの微生物培養で用いられる基質の有機物濃度に比べれば、余剰汚泥の有機物濃度はかなり低い。このため、メタン発酵では余剰汚泥を更に濃縮して基質として用いている。一方、多くの下水処理場では余剰汚泥を初沈汚泥を混合して嫌気消化した後汚泥を脱水して排出している。脱水汚泥は主に焼却による中間処理を経て埋め立てられる。有機物資源として、脱水ケーキを見た場合、脱水されている分だけ有機物質がケーキ中に濃縮されている。しかし、固体状であるためハンドリング性が悪く、微生物培養の基質として用いる場合にも固体培養に限られる。

下水処理場から排出される余剰汚泥を有機質資源として利用する方策として、余剰汚泥を液体培地としてみちいる方法と脱水ケーキを固体培地として用いる方法がある。いずれの場合にしても、余剰汚泥中に含まれる活性汚泥微生物をそのままの形で他の微生物培養に供することはできない。活性汚泥微生物に対して何らかの処理を施して、目的微生物が資化しやすいようにすることが必要となる。従って、余剰汚泥あるいは脱水ケーキに対して細胞壁を破壊するための前処理を行い、有機性基質としての質を高める方策が必要である。

### 1-3 汚泥の前処理

細胞壁を破碎する技術は、菌体内生産物の回収方法として研究方法として確立されており、また実用化されている。菌体破碎技術は、熱的、機械的、化学的、生物学的方法に大別される。

熱的方法には、低温加熱（100℃以下）、オートクレーブ（121℃～170℃程度）、湿式酸化、亜臨界水処理、超臨界水処理（臨界点 374℃、220 気圧）などがある。超臨界水処理は有機物質を完全に無機化することを目的としているため、汚泥の資化性を高めるための前処理方法としては不適當であろう。亜臨界水処理では固形分の可溶化とともに高分子化合物の低分子化が起こり、固形廃棄物を液体培地に変換する方法として有効であろう。一方、加熱温度が 160～170℃程度では、固形分を完全に可溶化することはできないが、有機物質の無機化をある程度防止できる。また、比較的低温の加熱処理では、固形分の可溶化はそれほど期待できないが、タンパクや細胞壁の変性を引き起こすことで他の微生物による資化性が高まると期待される。熱的方法は一般にエネルギー消費量が高いと考えられる。

機械的方法には、超音波処理、ビーズミル破碎、フレンチプレスなどがあげられる。これらは固形分を完全に可溶化するよりも、細胞壁を破碎して細胞内内容物を漏出・可溶化することが主な目的となる。機械的処理は比較的エネルギー多消費であるが、細胞内容物の変性が比較的少ない。

化学的方法では、オゾンや過酸化水素などの酸化剤が用いられる。活性汚泥法では、オゾン酸化法により余剰汚泥の一部を可溶化して曝気槽に返送することにより余剰汚泥の発生量を削減する方策が実用化されている。なお、塩素処理では有機塩素系化合物が非意図的に生成される危険性がある。

生物学的方法としては、好熱・好アルカリ性細菌により生産される加水分解酵素群を用いる方法がある。生物学的方法は、化学的あるいは熱的方法と異なり比較的マイルドな条件で細胞壁を破碎できるために、細胞内容物の変性が少ないという特徴がある。しかし、加水分解酵素を生産するためのコストが高く、処理速度も比較的低いという欠点がある。

これらの前処理を、エネルギー多消費高速処理型とエネルギー少消費低速処理型に分類し直すこともできる。エネルギー多消費高速処理型は、文字通り、多くのエネルギーをかけて固形分を完全に可溶化することを目的とした処理方法である。一方、エネルギー少消費低速処理型は、細胞壁に損傷を与える程度の効果を期待する方法である。前処理に要するコストと前処理によって生じる利益とのバランスによって、適用できる前処

理方法が決まる。余剰汚泥を対象とした場合、余剰汚泥の持っている有機物質としてのポテンシャルが比較的低いのでよほど高付加価値な生産物質を生産するのではなければ、前処理にコストをかけることはできない。本研究では、後述するように、余剰汚泥を基質としたバイオ殺虫剤の生産を念頭に置いて、余剰汚泥の資化性を向上させるための前処理方法を検討した。バイオ殺虫剤は、後述するように、基質コストが高いことが欠点となっている。余剰汚泥を基質をして利用できればバイオ殺虫剤の生産コストに低減につながるが、前処理に多くのエネルギーを使用することはできない。従って、本研究ではエネルギー少消費型の前処理方法を検討することとした。

#### 1-4 バイオ殺虫剤

*Bacillus thuringiensis* は、孢子形成時に $\delta$ -エンドトキシンと呼ばれる結晶性封入体を生産する。この結晶性封入体はタンパクで構成され、鱗翅目、双翅目、鞘翅目の幼虫に対して殺虫効果を持つ。これらの幼虫に対する殺虫性毒素（Bt 剤）の有効性は、それを生産する *B. thuringiensis* の種類により異なる。*B. thuringiensis* の生産する殺虫性毒素を殺虫剤として用いることは、1950 年より農地や森林において商業規模で実施されている。Bt 剤は多くの国で害虫駆除に用いられており、1990 年には全世界で3億米ドルの売り上げが報告されている。

Bt 剤の欠点は生産コストが高いことである。Bt 剤の生産コストの中で培地費用が最も高い。Bt 剤を低コストで生産するために余剰汚泥の利用が検討されている。しかし、余剰汚泥は前述したように資化性が低いために、何らかの前処理が必要となる。ここで、*Bacillus* 属の細菌は著量の加水分解酵素を菌体外に分泌し、多糖類やタンパクを加水分解して資化することが知られている。余剰汚泥の固形分を完全に可溶化（＝低分子化）しなくても、目的とする細菌の細胞壁に損傷を与え、*Bacillus* が生産する菌体外加水分解酵素が働きやすい状況を作ることができれば前処理の効果が発揮されると考えられる。すなわち、前処理によって高分子物質を低分子化して資化性を直接高めるのではなく、*Bacillus* が生産する菌体外加水分解酵素を働かせるために適した前処理方法を見いだすことができれば、前処理に必要なエネルギーコストを抑えながら余剰汚泥を基質としたバイオ殺虫剤の生産が可能となり、余剰汚泥再利用の選択肢が広がると期待される。従って、本研究ではエネルギー消費の少ないできるだけマイルドな条件で前処理を行うこととした。

一方、余剰汚泥よりも汚泥脱水ケーキの方が有機質エネルギー密度（有機物濃度）が高い。汚泥脱水ケーキを基質として用いる場合には必然的に固体培養となる。この場合、*B. thuringiensis* が生産した殺虫性毒素は固体培地中に分散されるため、殺虫性毒素を固体培地から分離することは困難となる。従って、固体培養により Bt 剤を生産する場合には、殺虫性毒素を分離しなくても製品になるような用途を考える必要

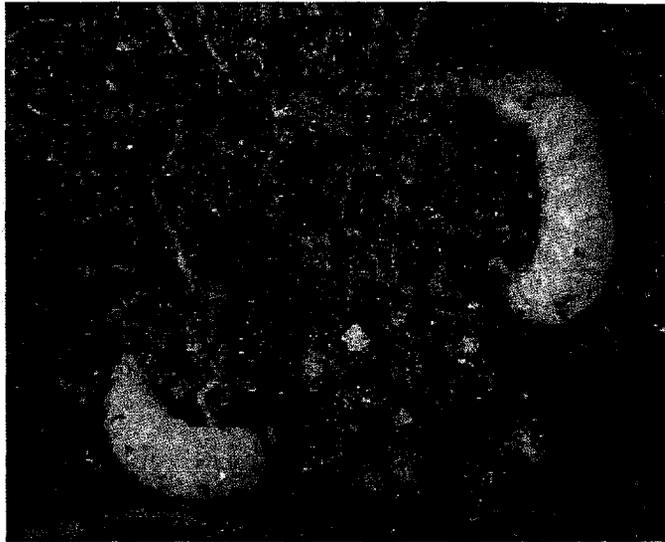


図2 地虫

がある。そのような一例として、地虫に対して殺虫効果のある堆肥の製造があげられる。*B. thuringiensis* の中にはコガネムシの幼虫など地虫に特異的に作用する殺虫性毒素を生産するものがある。果樹園などではコガネムシの幼虫による根切り被害が知られており、抗地虫性のある堆肥を製造することができれば堆肥の高付加価値化にもつながる。また、地虫の発生しにくい堆肥であればガーデニングなどへの用途も期待できる。抗地虫性の堆肥を目的生産物とすれば、*B. thuringiensis* を固体培養したケーキをそのまま堆肥に混合すればよいので、固体培地そのものを製品化でき、廃棄物や廃水処理などの後処理は必要ない。

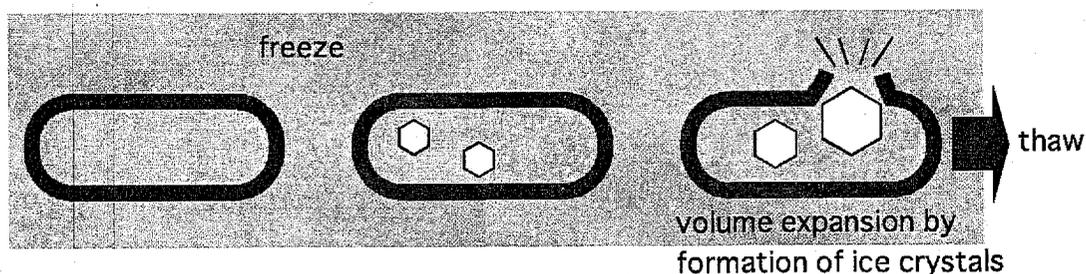
このような背景から、本研究では余剰汚泥ならびに脱水ケーキを有機質基質として用いて *B. thuringiensis* によるバイオ殺虫剤生産の可能性を、汚泥前処理の効果とあわせて検討した。

## 第2章 余剰汚泥スラリーを対象とした細胞壁破碎処理の効果

### 2-1 緒言

余剰汚泥を有機基質として利用する場合、余剰汚泥の持っているエネルギーレベルは低く、生産物の付加価値も極めて高いという訳ではない。また、抗地虫性を付与するために堆肥と混合する固体培養物の量も堆肥の数%程度であり、比較的少量であると予想される。従って、汚泥の資化性を向上させることを目的とした前処理に多くのエネルギーをかけることは不可能であろう。本研究では、前処理方法として主に凍結融解と気泡析出を取り上げた(図3)。

#### Freeze/thaw treatment



#### Microbubble expansion treatment

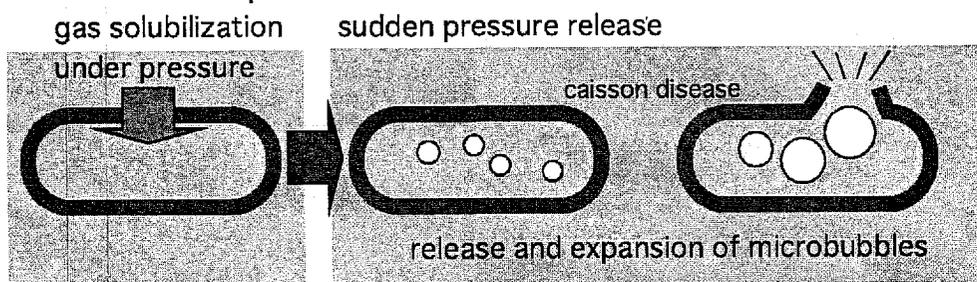


図3 凍結融解処理と気泡析出処理

凍結融解処理は、菌体内の水を凍結させることにより菌体内容物の体積を膨張させて細胞壁を破壊する方法である。凍結融解処理は、汚泥を処理する際に必要なエネルギーが主に凝固潜熱であることから、特に寒冷地では省エネルギー的效果が期待できる。また、低温で処理をするため有機物の変性が少ないことが期待される。

気泡析出処理は、加圧下で細胞内に気体を溶解させた後、大気圧に戻すことによって細胞内で気泡を析出・膨張させて細胞壁を破壊する方法である。気泡析出処理は常温で行うため有機物の熱変性を避けることができると期待される。本研究では、水に対する

溶解度が比較的大きい二酸化炭素ガスを用いて気泡析出処理を行った。

これらの機械的方法に加えて、従来より検討されている可溶化前処理方法として超音波処理、過酸化水素処理、オゾン処理を取り上げた。また、加熱殺菌を想定して、オートクレーブによる加熱処理も検討した。

それぞれの前処理において、可溶化率とエネルギー効率の観点より、可溶化の効果を検討した。

## 2-2 実験装置と方法

### (1) 汚泥試料

新潟市中部下水処理場より採取した返送汚泥を、グルコース、ペプトン、リン酸1カリウム、硫酸アンモニウムを主成分とする合成廃水を用いて馴養した汚泥を用いた。馴養汚泥の MLVSS/MLSS は約 0.7~0.8 であった。蒸留水を用いてデカンテーションを 3~4 回繰り返して汚泥を洗浄した。洗浄後の上澄み液の DOC 濃度は 5~18 mg/L の範囲であった。この汚泥スラリーを所定の濃度に重力濃縮して用いた。

### (2) 凍結融解処理

MLVSS 濃度を調製した汚泥スラリー 20 mL を培養試験管 (直径 25 mm) に入れ、低温恒温槽 (井内盛栄堂, LTB-250) 中で凍結させた。凍結時間は 24 時間とし、その後常温で解凍した。凍結温度は  $-30^{\circ}\text{C}$  ~  $-2^{\circ}\text{C}$  の範囲で変化させた。凍結温度が  $-6^{\circ}\text{C}$  ~  $-2^{\circ}\text{C}$  の範囲では、過冷却を防ぐためにスラリーをゆるやかに通気して攪拌した。

### (3) 気泡析出処理

試料採取用高压容器 (Swagelok, 304L-HDF-75, 75 mL) に汚泥スラリー 20 mL を入れ、容器中に二酸化炭素ガスを 5 分間通気した。その後、容器出口コックを閉じて容器内を加圧した。容器内の圧力はガス容器圧力調整器の 2 次圧力を調節することにより調整した。所定の時間保持した後、出口コックを開いて容器内を瞬間的に大気圧に開放し、気泡を析出させた。加圧ゲージ圧力は 0.1~0.5 MPa の範囲で変化させた。加圧状態における保持時間を 10~600 分の範囲で変化させた。

### (4) 超音波処理

超音波破碎装置 (島津, USP-50) を用いた。出力チップとして直径 3 mm のステップマイクロチップを用いた。出力はパワーモニターの値より求めた。汚泥を入れたビーカーの中心軸上に出力チップをセットし、チップ先端を 1 cm 程度汚泥スラリー中に入れた。処理時間を 10~30 min, 処理液体積を 30~100 mL の範囲で変化させた。

### (5) 過酸化水素処理

三角フラスコに MLVSS 濃度を調節した汚泥スラリーを入れ、30wt%過酸化水素水を加えた。過酸化水素の添加量を 2.3~5.3 g- $\text{H}_2\text{O}_2$ /g-MLVSS の範囲で変化させた。過酸化水素との接触時間 (反応時間) は 2 時間とした。

## (6) オゾン処理

オゾン発生装置（岡野製作所，EO-302）を用いてオゾンを発生させた。原料ガスとして純酸素を用いた。原料ガスの流量は 100 mL/min とした。100 mL 容ビーカーに汚泥スラリーを入れ，ガラス焼結スパージャーを用いてオゾンガスを供給した。ビーカーをセパラブルフラスコに入れた。入口オゾン濃度は 1.09%であった。セパラブルフラスコから排出される未反応オゾンを 10 wt% KI 溶液に吸収させた。オゾン添加率は，0.068～0.97 g-O<sub>3</sub>/g-MLVSS に設定した。この場合，オゾンの反応率は 0.044～0.19 g-O<sub>3</sub>/g-MLVSS であった。

## (7) オートクレーブ処理

小型高圧蒸気滅菌器（サクラ精機，ASV-3022）を用いて，121°Cでオートクレーブ処理を行った。保持時間は2～50分とした。

## (8) 分析方法

前処理の前後で MLSS, MLVSS 濃度，DOC 濃度，含水率を測定した。MLSS, MLVSS 濃度の測定は JIS K102 に準じて行った。DOC 濃度は，試料を遠心分離（10,000 rpm, 4°C, 15分）した後，上澄み液の TOC 濃度を TOC 濃度計（島津，TOC-500）を用いて測定することにより求めた。

ガス中のオゾン濃度はヨウ化カリウム吸収法により測定した。

## 2-3 実験結果と考察

### (1) 可溶化率と汚泥削減率

実験を行った全ての処理条件で、処理前後の DOC 濃度差は MLVSS 濃度に比例した (図 4)。余剰汚泥の可溶化率を、MLVSS 当たりの可溶化 DOC 量 [g-DOC/g- MLVSS] で定義した。可溶化率は前処理により異なった。

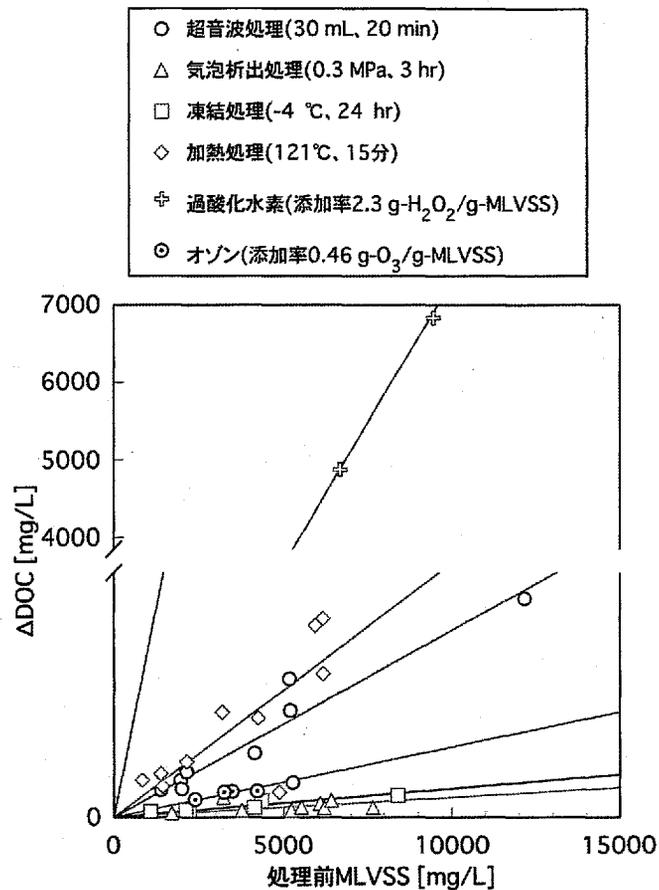


図 4 ΔDOC と MLVSS 濃度の関係

一方、処理前後の MLVSS 濃度も MLVSS 濃度に比例した。すなわち、汚泥削減率も MLVSS 濃度に比例した。しかし、図 4 に示した処理条件において、超音波処理による汚泥削減率は 7.2%、凍結融解処理は 11.9%、気泡析出処理は 3.9%、オートクレーブ処理は 12.4%、過酸化水素処理は 27.1%、オゾン酸化処理は 8.7%であった。これらの値は、従来報告されている汚泥削減率に比較してかなり低かった。

図 5 に可溶化率と汚泥削減率の関係を示す。可溶化率が高いほど汚泥削減率も高くなるが、その依存性は比較的小さいことがわかった。

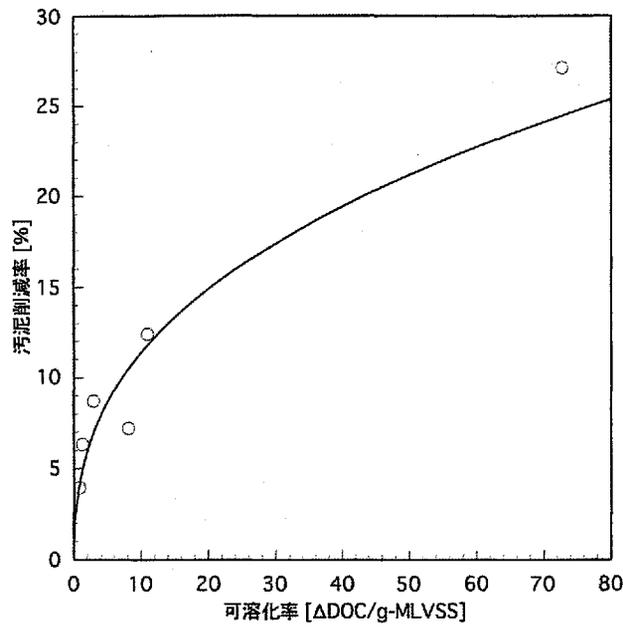


図5 汚泥削減率と可溶化率の関係

## (2) 凍結融解処理

余剰汚泥を凍結させた場合、いずれの凍結温度でも試験管壁から氷が成長し、汚泥が試験管軸上に濃縮された。凍結温度が $-2\sim-4^{\circ}\text{C}$ の範囲では透明な氷が生成した。凍結温度が下がるにつれて生成した氷が乳白色になり、ヒビが観察されるようになった。

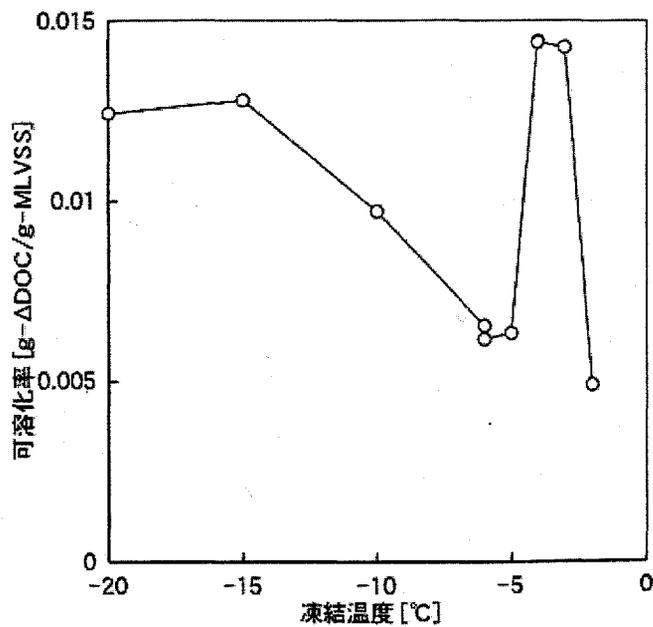


図6 可溶化率に及ぼす凍結温度の影響

また、水の表面が中心軸付近で盛り上がっていた。これは、試験管壁から氷の成長とそれにもなう汚泥の濃縮が進み、中心軸上に残った未凍結の汚泥が凍結する際に上方に体積増加が起こったためと考えられる。

図6に可溶化率に及ぼす凍結温度の影響を示す。凍結温度が $-15^{\circ}\text{C}$ 以下では、可溶化率に大きな差は見られなかった。凍結温度が $-15^{\circ}\text{C}$ よりも高くなるにつれ、可溶化率は低下したが、凍結温度 $-5\sim-3^{\circ}\text{C}$ で可溶化率がスパイク状に増加した。凍結温度 $-5\sim-3^{\circ}\text{C}$ は一般に氷結晶の成長速度が大きいといわれている。この凍結温度範囲で生成した氷が透明であることから、氷の結晶が大きく成長したことがわかる。凍結温度 $-5\sim-3^{\circ}\text{C}$ で可溶化率が急増した理由として、余剰汚泥の細胞内で氷結晶が大きく成長して細胞壁に損傷を与えやすくなったことが考えられる。一方、凍結温度 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下では氷が乳白色になりヒビも観察された。これは、氷結晶の成長とともに結晶間で歪みが生じていることを示している。凍結温度 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下では、細胞内での氷結晶の成長に加えて、凍結による機械的な外力が菌体に働いたために可溶化率が高くなったものと考えられる。

これを確かめるために、試験管外壁を発泡スチロールで断熱し、凍結とともに試験管を徐々に恒温水槽中に下げることによって、試験管底面から水面に向かって凍結させた場合についても検討した。凍結温度 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-10^{\circ}\text{C}$ のいずれの場合についても、壁面から凍結させた場合の可溶化率が約20~50%高かった。この結果より、凍結融解処理において、凍結時に生じる機械的な歪みも可溶化に寄与することが分かった。

### (3) 気泡析出処理

二酸化炭素ガス圧力  $P = 0.3 \text{ MPa}$  (約3気圧) の条件で気泡析出処理を行った場合の可溶化率に及ぼす保持時間の関係を図7に示す。可溶化率は保持時間とともに増加するが、3時間以上ではほとんど一定になった。本研究では、加圧容器の構造上加圧下で汚泥スラリーを攪拌することはできない。従って、汚泥スラリーが静置している状態で二酸化炭素が溶解することになる。図7の実験条件では、保持時間3時間は高压容器内で汚泥スラリーと二酸化炭素が溶解平衡に達するまでに必要な時間であると判断される。気液平衡に達するまでに必要な時間は気液接触方法に依存する。従って、効率的な気液接触方法を採用することにより気泡析出処理に必要な保持時間を短くすることができる。

図8に保持時間を1hとした場合の可溶化率と圧力の関係を示す。可溶化率はほぼ圧力に比例した。水への二酸化炭素の溶解はヘンリーの法則に従い、汚泥スラリー中の菌体内に溶解する二酸化炭素量も圧力に比例する。その結果、圧力の増加にもなって可

溶化率が増加したものと考えられる。

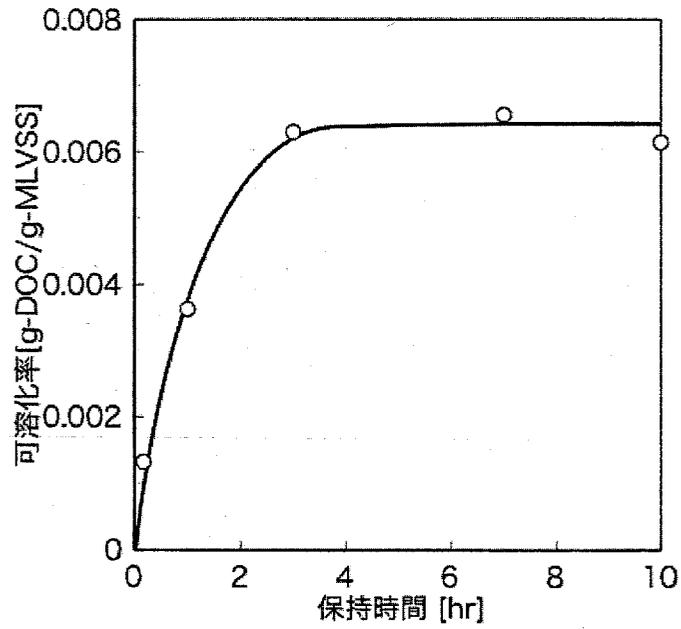


図7 可溶化率に及ぼす保持時間の影響

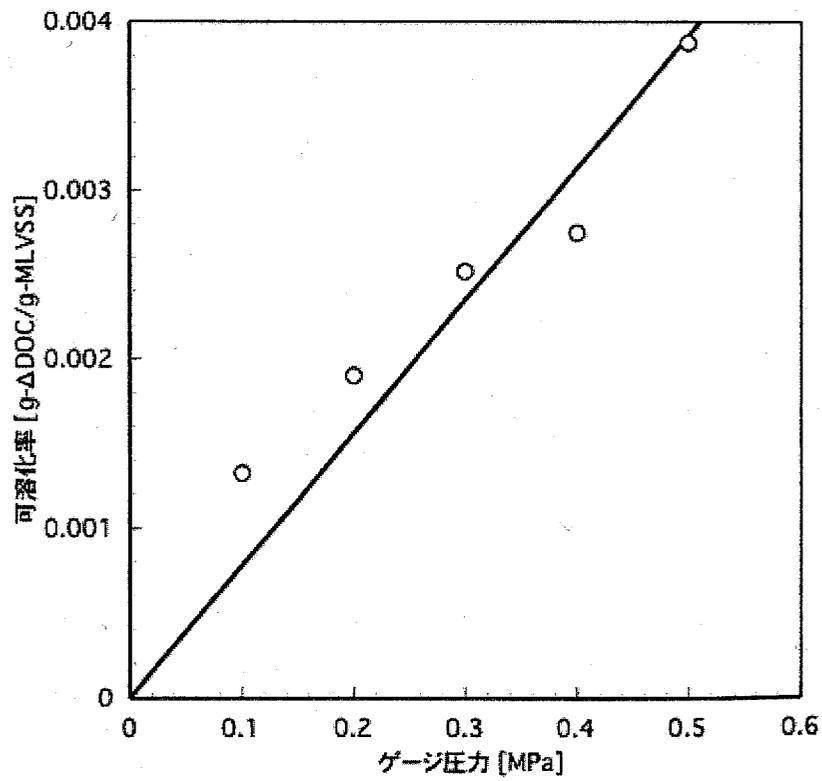


図8 可溶化率に及ぼす加圧圧力の影響

#### (4) 超音波処理

超音波処理はキャビテーションにより発生した気泡が圧壊するときに発生する局所的な高温状態を利用する方法である。活性汚泥法では、返送汚泥の一部を超音波処理により可溶化して曝気槽に返送し、余剰汚泥の発生量を削減する方策として実用化されている。また、反応場として超音波照射場を利用するソノプロセスも注目されている。

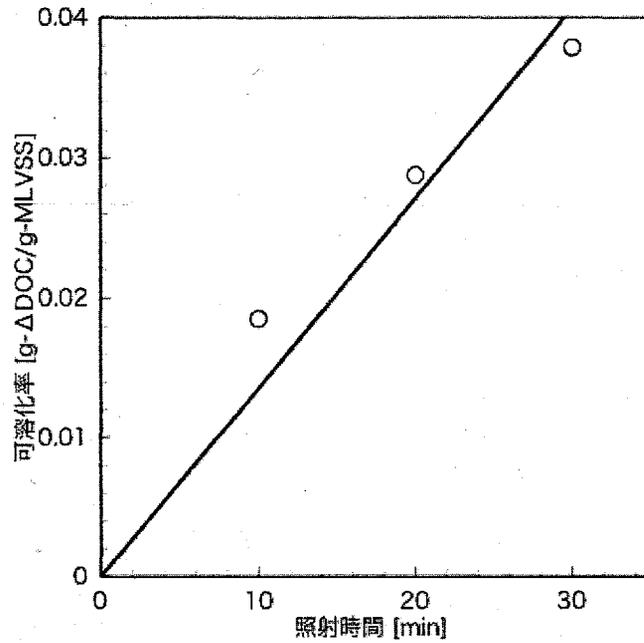


図5 可溶化率と照射時間の関係

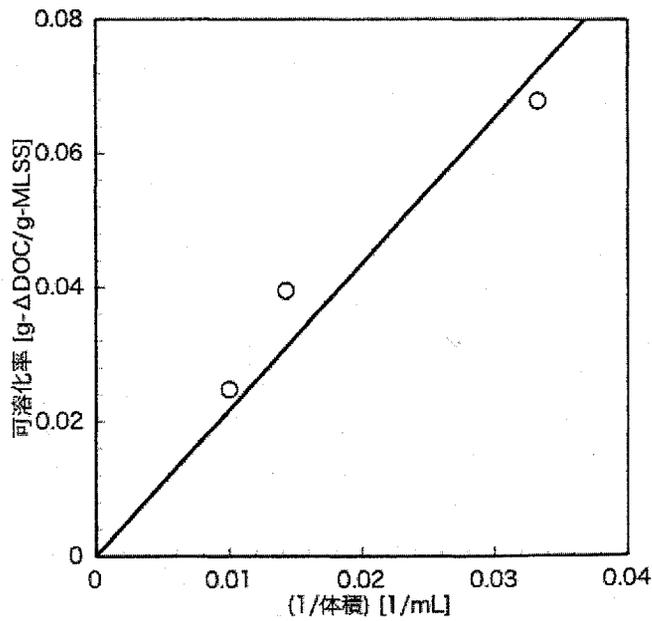


図10 可溶化率と比エネルギーの関係

図9に、処理体積を30 mLとした場合の可溶化率に及ぼす処理時間の影響を示す。また、図10に超音波照射時間を20 minとした場合について可溶化率と処理体積の逆数の関係を示す。本研究では、超音波出力を3Wで一定として処理を行った。従って、図10の横軸は単位体積当たりのエネルギーP/Vに相当する。超音波処理による汚泥の可溶化は、単位液体積当たりの投入エネルギー、すなわち比投入動力に比例した。これは、全投入動力のうち菌体の破碎に使われた割合が等しいこと、換言すれば、本実験範囲内では熱によるエネルギー散逸量の割合が一定であることを示している。

超音波処理は装置の形状や定在波の存在など、多くの因子が性能に影響を及ぼすことが知られている。従って、超音波処理を行う場合には、装置の形状や処理規模を含めてプロセスの最適化を行う必要がある。本研究では、他種類の可溶化方法の性能を大まかに比較することを目的としており、処理プロセスそのものを最適化することが目的ではない。すなわち、現段階では各処理方法の大まかな特徴と可能性を評価することが本研究の目的である。

#### (5) 過酸化水素処理

過酸化水素処理は給水、給湯や廃水などの配管系における生物膜を対象とした殺菌操作にも用いられている。特に、酸素ガスが発生することにより生物膜の剥離効果も期待できることから、配管系統における生物膜のコントロールにも使用されることが多い。

図11に過酸化水素の添加率を5.03 g-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g-MLVSSとした場合の可溶化率の経時変化を示す。可溶化率は1時間までに急激に増加し、それ以後は可溶化率の変化はほとんど見られなかった。また、図には示していないが、無機性炭素も処理開始1時間程度で約30 mg/Lに増加し、その後はほぼ一定であった。有機性炭素と無機性炭素の変化は同様であった。可溶化率は過酸化水素添加率にほぼ比例した。過酸化水素処理における比可溶化率は $1.13 \times 10^{-2}$  g-DOC/g-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>であった。Camachoら(2002)は過酸化水素処理と加熱処理を組み合わせた場合の汚泥の可溶化を報告している。彼等の結果では、過酸化水素添加率0.25 g-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g-MLVSS以下の場合の可溶化率は0.10 g-TOC/g-MLSS、比可溶化率は0.40 g-DOC/g-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>であった。本研究では加熱処理を併用しておらず、Camachoらを使用した汚泥の性状も不明なため彼等の結果とは直接比較することはできないが、比可溶化率はCamachoらの結果に比べてかなり小さい。比可溶化率が低い理由として、過酸化水素の添加量が多いことに加えて、新潟市の下水汚泥は鉄の含有量が比較的多いため過酸化水素の分解が有機物の酸化以上に進んだことが考えられる。

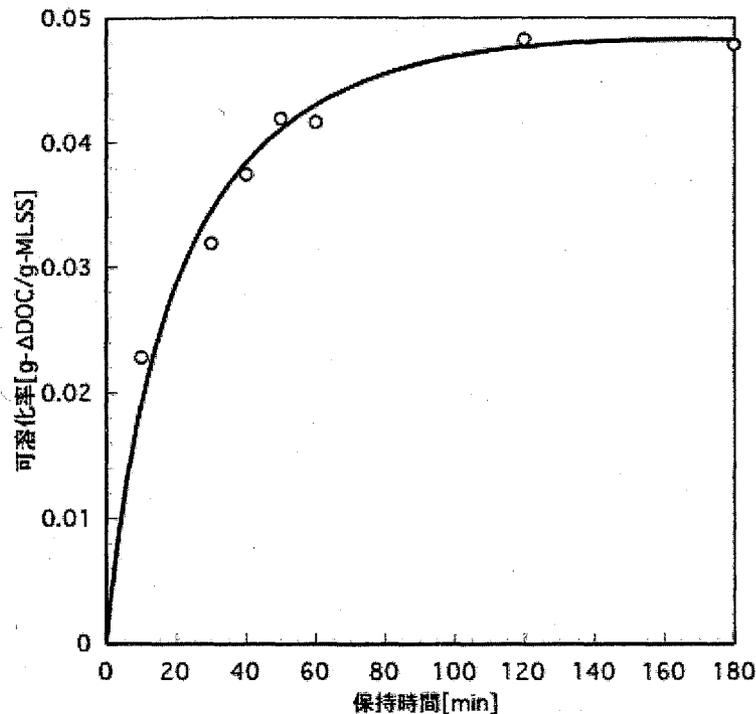


図 11 過酸化水素処理における可溶化率の変化

## (6) オゾン酸化

オゾン添加率と可溶化率の関係を図 12 に示す。可溶化率はオゾン添加量に比例して増加したが、原点は通過しなかった。可溶化率が 0 に相当するオゾン添加量は約 3% であった。これは、菌体壁を破壊するよりも、少量のオゾンが汚泥スラリー中に含まれる酸化されやすい物質の酸化のために使われることを示唆している。一方、オゾン添加量当たりの可溶化率は約 0.2 g-DOC/g-ozone であった。

反応容器出入り口のオゾン濃度よりオゾンの反応率 (利用効率) を求めた。その結果、供給されたオゾンの約 60% が容器内で消費されていることが分かった。本研究ではオゾンの吸収効率に関して、スパージャーの形式など装置工学的な検討は行っていない。このため、このオゾンの利用効率を他の装置と比較することは困難であり、オゾン処理の可溶化効率を他の装置と比較することも困難である。

図 13 にオゾンの反応率 [g-ozone/ g-MLVSS] と可溶化率の関係を示す。可溶化率はオゾン反応率に比例して増加した。その直線の傾きより、オゾン反応量当たりの可溶化量 (比可溶化率) を求めた。オゾン処理に関する比可溶化率は約 0.30 g-DOC/g-ozone であった。この値は、大山らの結果 (0.72 g-TOC/g-ozone) と比較するとやや小さい。その理由としては、過酸化水素処理の項目でも述べたが、供試汚泥 (消化汚泥と生汚泥の混合物) には比較的多量の鉄が存在しており、それがオゾン消費量を増加させたと考えら

れる。

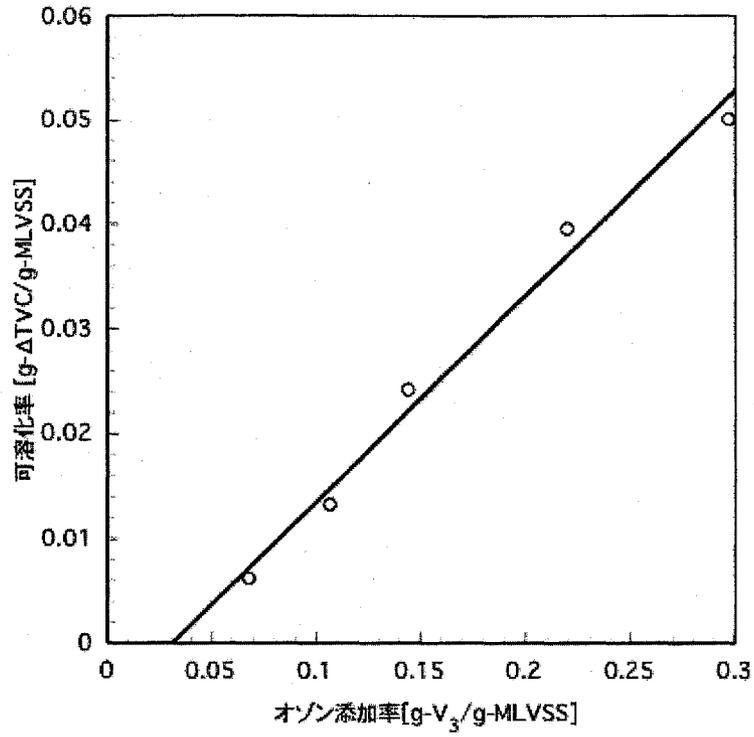


図 12 可溶化率とオゾン添加率の関係

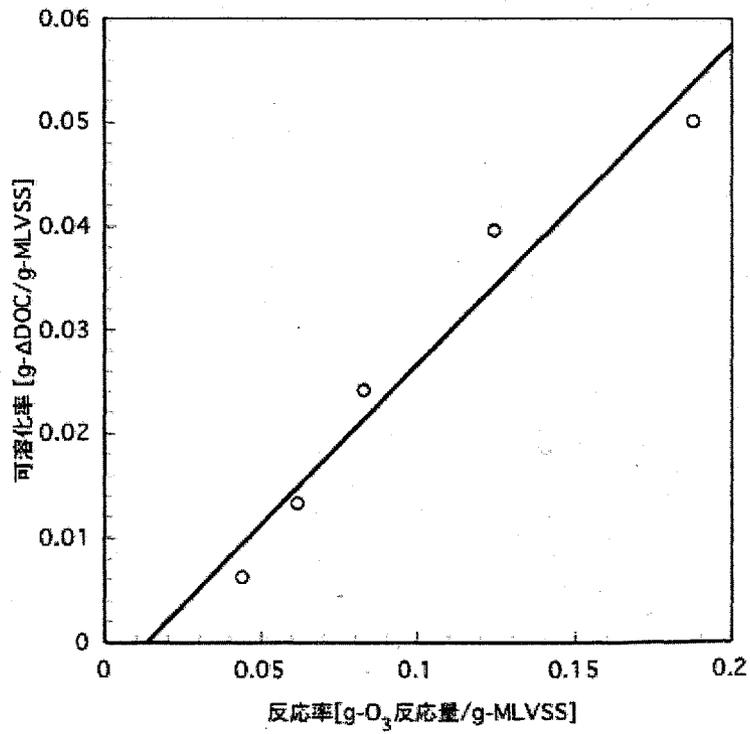


図 13 可溶化量とオゾン消費量の関係

以上のように、凍結融解、気泡析出、超音波、過酸化水素、オゾンの各前処理に関して、操作条件の最適化は行っていないが、可溶化率に及ぼす主な操作条件の影響を概略的ではあるが明らかにすることができた。

### (7) 可溶化エネルギー効率

余剰汚泥を対象とした前処理のそれぞれについて操作条件の最適化を行っていないが、それぞれの処理方法について可溶化のエネルギー効率を評価することは、予備的ではあるが有用な知見が得られると判断した。本研究では、被処理 MLVSS 量当たりのエネルギー [kJ/g-MLVSS]により可溶化エネルギー効率を評価した。

#### 凍結融解処理におけるエネルギー

凍結融解(Freeze/Thaw)処理では、汚泥スラリーを所定の凍結温度まで冷却するために必要なエネルギー $E_{F/T}$ を所要エネルギーと定義した。

$$E_{F/T} = E_C + E_{L \rightarrow S} + E_F \quad (1)$$

ここで、 $E_C$ は汚泥スラリーを $25^\circ\text{C}$ から $0^\circ\text{C}$ まで冷却(Cooling)するために必要なエネルギーであり、 $E_{L \rightarrow S}$ は汚泥スラリーを凝固させるために必要なエネルギー、 $E_F$ は $0^\circ\text{C}$ の水を凍結温度まで冷凍(Freezing)するために必要なエネルギーである。ここで、凝固点降下は無視し、汚泥スラリー、凍結した汚泥の比熱や凝固熱は水の物性値に等しいと仮定した。

$$E_C = C_{P,liq} \rho_{liq} V_{liq} \Delta T \quad (2)$$

$$E_{L \rightarrow S} = Q_S \rho_{liq} V_{liq} \quad (3)$$

$$E_F = C_{P,sol} \rho_{sol} V_{sol} \Delta T_F \quad (4)$$

ここで、 $C_{P,liq} = 4.18 \text{ kJ/kgK}$ は水の定圧比熱、 $\rho_{liq}$ は水の密度、 $V_{liq}$ は汚泥スラリーの体積、 $\Delta T = 25^\circ\text{C}$ は常温から凝固点までの温度差である。また、 $Q_S = 334 \text{ kJ/kg}$ は水の凝固熱、 $C_{P,sol} = 0.117 \text{ kJ/kgK}$ は氷の定圧比熱、 $\rho_{sol}$ は氷の密度、 $V_{sol}$ は氷の体積、 $\Delta T_F$ は $0^\circ\text{C}$ から凍結温度までの温度差である。

(1)式より評価されるエネルギーは凍結に必要なエネルギーであり、凍結形式、装置形状の違いや冷凍機の能力は考慮していない。また、融解時における冷熱エネルギー回収も考慮していない。凍結融解処理では、汚泥スラリーを凍結する際に凍結濃縮が同時に進行する。融解操作を適切に行うことによって、エネルギーの回収とともに融解後の

汚泥濃度（有機物濃度）を高められる可能性がある。

### 気泡析出処理におけるエネルギー

気泡析出処理では、まず、圧力容器内に汚泥スラリーを入れ、気相部に二酸化炭素ガスを圧入する。汚泥スラリーを加圧下で二酸化炭素ガスと所定時間接触させて、二酸化炭素を溶解させる。その後、容器内の圧力を大気圧に開放して、溶解していた二酸化炭素を気泡として析出させる。可溶化に寄与する二酸化炭素は、細胞内部に溶解した量である。細胞外のバルク液に溶解した二酸化炭素量や気相部の二酸化炭素は細胞壁の破壊には寄与しないが、細胞内に二酸化炭素を溶解させるために必要である。従って、気泡析出(Bubble Expansion)のエネルギー $E_{BE}$ を、高圧容器内の気相部に存在する二酸化炭素とスラリー中に溶解しており減圧した際に析出する二酸化炭素が断熱膨張する際のエネルギーと定義した。

$$E_{BE} = nC_V\Delta T \quad (5)$$

ここで、 $n$  は断熱膨張する二酸化炭素のモル数、 $C_V$  は定容比熱、 $\Delta T$  は常温で断熱膨張させた場合の温度差である。ここで、膨張前の温度を  $25^\circ\text{C}$  と仮定した。

$$n = n_{gas} + n_{liq1} - n_{liq2} \quad (6)$$

$n_{gas}$  は圧力容器内気相部に存在する二酸化炭素のモル数、 $n_{liq1}$  は加圧下で容器内液相部に溶解している二酸化炭素のモル数、 $n_{liq2}$  は大気圧下で容器内液相部に溶解している二酸化炭素のモル数である。二酸化炭素は理想気体であると仮定した。また、加圧下あるいは大気圧下における二酸化炭素の汚泥スラリーへの溶解度は、水への溶解度に等しいと仮定した。さらに、二酸化炭素の水への溶解度はヘンリーの法則に従うと仮定した。

$$p_{CO_2} = Hx_{CO_2} \quad (7)$$

ここで、 $p_{CO_2}$  は気相の二酸化炭素分圧、 $H$  はヘンリー定数、 $x_{CO_2}$  は液相における二酸化炭素のモル分率である。本研究では、純二酸化炭素により加圧したので  $P_T = p_{CO_2}$ 。また、 $25^\circ\text{C}$  における二酸化炭素-水系のヘンリー定数として次の値を用いた。

$$H = 165.8 \text{ MPa}$$

また、水のモル数  $n_{H_2O}$  に比べて溶解している二酸化炭素のモル数は無視できるとし、(7) 式を次式で近似した（モル分率ではなく、モル比を用いた）。

$$P_{T1} = H \frac{n_1}{n_{H_2O}} \quad P_{T2} = H \frac{n_2}{n_{H_2O}} \quad (8)$$

次に気体の断熱膨張後の温度  $T_2$  を求める。断熱膨張前の気体の圧力と温度を  $P_1, T_1$  とし、膨張後の圧力と温度を  $P_2, T_2$  とする。

$$\frac{T_2}{T_1} = \left( \frac{P_2}{P_1} \right)^{\left( \frac{\gamma-1}{\gamma} \right)} \quad (9)$$

$$\text{ここで } \gamma = \frac{C_p}{C_v} \quad (10)$$

$C_p$  は定圧比熱、 $C_v$  は定容比熱である。二酸化炭素は三原子気体であるから、三原子理想気体の理論値より  $\gamma=1.154$  と仮定して  $T_2$  を推定した。推定した  $T_2$  における  $\gamma$  の実測値を求め、さらに  $T_2$  を推定した。仮定した  $\gamma$  の値と推定温度における  $\gamma$  の値が一致するまで上記の計算を繰り返した。その結果、 $\gamma$  の値は 1.3、 $P_1=0.2\sim 0.6$  MPa の範囲における  $T_2$  は加圧圧力に応じて  $13.3\sim 21.3^\circ\text{C}$  の範囲にあった。

二酸化炭素の定容比熱  $C_v$  は(10)式と定圧比熱  $C_p$  の値より求めた。二酸化炭素の定圧比熱  $C_p$  の値は次式より求めた。

$$C_p = a + bT + \frac{c}{T^2} \quad (11)$$

$$a = 44.22 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$$

$$b = 8.79 \times 10^{-3} \text{ JK}^{-2}\text{mol}^{-1}$$

$$c = -8.62 \times 10^5 \text{ JKmol}^{-1}$$

加圧圧力の範囲に応じて、汚泥スラリー 20 mL 中に溶解した二酸化炭素量は  $2.9 \times 10^{-7} \sim 1.7 \times 10^{-6}$  g、気相の二酸化炭素量に対する溶解した二酸化炭素のモル数比は  $2.86 \times 10^{-4} \sim 2.94 \times 10^{-4} \%$  であった。気泡析出では、気相部の体積をできるだけ少なくする装置構造がエネルギー的に有利であることが示された。

### 超音波処理におけるエネルギー

超音波破碎機の出力を 3 W に調節した。ホーンから放出される超音波エネルギーがすべて汚泥スラリーに伝えられたと仮定し、出力と照射時間の積より超音波エネルギーを求めた。

### オートクレーブ処理におけるエネルギー

温度 121°C でオートクレーブ処理を行った。オートクレーブ処理におけるエネルギー  $E_{AC}$  を、汚泥スラリーを 25°C から 121°C に加熱するためのエネルギー  $E_H$  と 121°C 加圧下の水蒸気を断熱膨張させた時のエネルギー  $E_{AE}$  の合計として定義した。ここで、汚泥スラリーの物性値は水に等しいと仮定した。  $C_p = 4.18 \text{ kJ/kgK}$ 。

$$E_{AC} = E_H + E_{AE} \quad (12)$$

$$E_H = C_p \rho V_{liq} \Delta T \quad (13)$$

また、水蒸気の断熱膨張エネルギーは気泡析出の場合と同様な手順で計算した。

MLVSS 当たりのエネルギーは、オートクレーブ処理で 50~600 kJ/kg-MLVSS、凍結融解処理で 30~700 kJ/kg-MLVSS、超音波処理では 1~80 kJ/kg-MLVSS、気泡析出処理では 0.01~0.1 kJ/kg-MLVSS の範囲であった。オートクレーブ処理と凍結融解処理はエネルギー投入量が同程度であった。気泡析出処理は他の方法に比べてかなりエネルギー投入量が小さいことがわかった。

図 14 に可溶化エネルギー効率と可溶化率の関係を示す。気泡析出処理の投入エネルギー当たりの可溶化量は 0.05~1 g-TOC/kJ の範囲にあり、他の処理方法に比べてかなり高いことが分かった。しかし、これは気泡析出のエネルギーを二酸化炭素の断熱膨張エネルギーと定義しているため、前処理に必要なエネルギーを過小評価していることも一因であろう。気泡析出処理の可溶化率は 1~200 g-TOC/kg-MLVSS と他の処理方法に比べて小さかった。超音波処理の可溶化エネルギー効率は 0.001 g-TOC/kJ のオーダーであり、オートクレーブ処理の場合と同程度であった。凍結融解処理の可溶化エネルギー効率は  $10^{-5}$ ~ $10^{-3}$  g-TOC/kJ の範囲にあり、最も低かった。一方、オートクレーブ処理の可溶化率は 0.1 g-TOC/g-MLVSS のオーダーであった。超音波処理では 0.001~0.1 g-TOC/g-MLVSS、凍結融解処理の可溶化率は 0.005~0.07 g-TOC/g-MLVSS の範囲にあった。

気泡析出処理は、エネルギー効率は高いものの可溶化率は比較的小さかった。オート

クレープ処理と超音波処理，凍結融解処理はエネルギー効率はやや低いものの，可溶化率は比較的高かった。これらの中で，超音波処理は，可溶化エネルギー効率があまり変化しない処理方法であり，これとは対照的に，オートクレープ処理は可溶化率に差が出にくい処理方法であると評価することもできる。

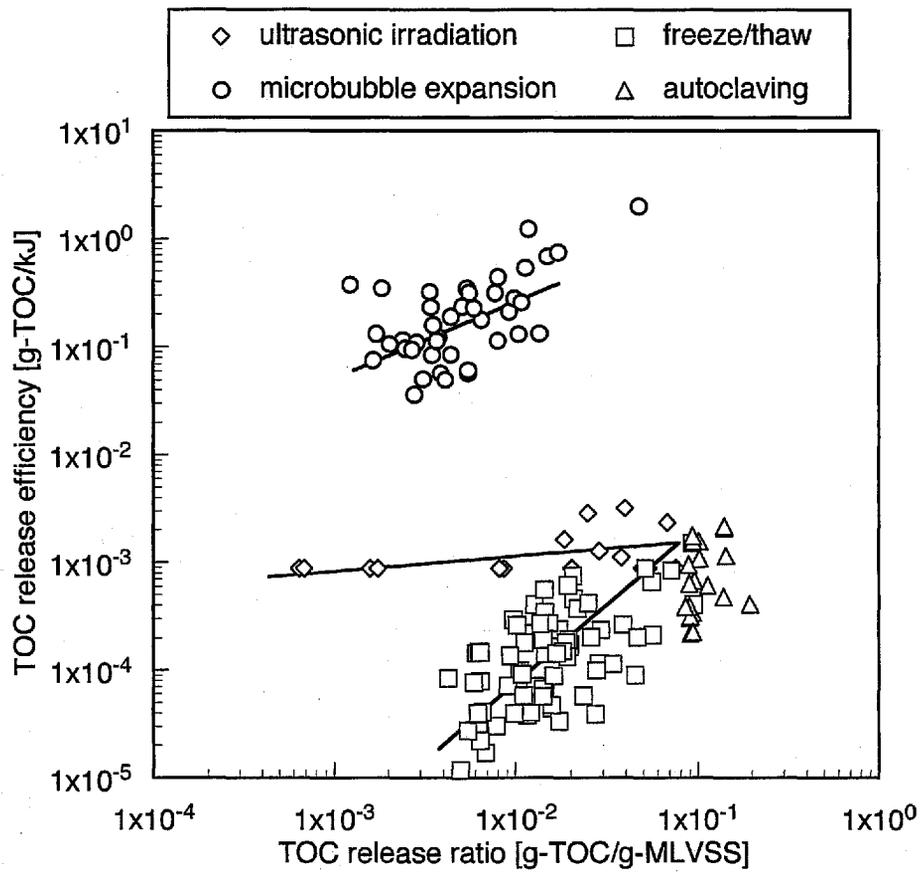


図 14 可溶化エネルギー効率と可溶化率の関係

## 2-4 まとめ

余剰汚泥返送スラリーを対象として、凍結融解、気泡析出、超音波照射、オートクレーブ、過酸化水素酸化、オゾン酸化といった前処理方法を取りあげ、細胞壁破碎処理の効果を検討した。それぞれの前処理方法について代表的な操作パラメーターの影響を明らかにした。

凍結融解、気泡析出、超音波照射、オートクレーブ処理について、所要エネルギーを概算し、可溶化処理のエネルギー効率を評価した。気泡析出処理は、可溶化率は低いものの可溶化エネルギー効率が高い処理方法であることが分かった。超音波処理、オートクレーブ処理は、可溶化エネルギー効率は低いものの可溶化率が比較的高い処理方法であることが分かった。凍結融解処理は可溶化エネルギー効率、可溶化率ともに、超音波処理やオートクレーブ処理に比べて、やや低いことが分かった。

## 第3章 汚泥脱水ケーキを対象とした細胞壁破碎処理の効果

### 3-1 緒言

返送汚泥は活性汚泥混合液に比べて重力濃縮されているとはいえ、返送汚泥中の懸濁物質濃度はせいぜい数%である。発酵プロセスは通常固形分を含まない液体培地を用いて行われ、液体培地の炭素源濃度は数%である。従って、微生物培養用の基質として返送汚泥を評価した場合、微生物が資化できる有機物濃度が低いという欠点がある。この欠点を克服する方法として、余剰汚泥を脱水したケーキを固体培養の基質として用いる方法がある。汚泥脱水ケーキを固体培養用基質として利用する場合においても、余剰汚泥の場合と同様に、前処理により資化性を高める必要がある。

汚泥ケーキを対象とした場合、固体試料に適用できる前処理を選択する必要がある。汚泥スラリーを対象とした前処理では、凍結融解、気泡析出、超音波照射、過酸化水素酸化、オゾン酸化、オートクレーブ処理を取り上げた。このうち、超音波照射は空気中で行えないため、脱水ケーキの可溶化処理方法としては不適切である。従って、脱水ケーキ用前処理方法として、凍結融解、気泡析出、過酸化水素酸化、オゾン酸化、オートクレーブ処理を取り上げた。

本章では、新潟市下水処理場より採取した脱水汚泥ケーキならびに余剰汚泥の脱水ケーキを試料として用いて、可溶化に及ぼすこれら前処理の影響を検討した。

### 3-2 実験装置と方法

#### (1) 試料

図 15 に下水処理場における典型的な処理フローを示す。下水処理場に流入した下水は、スクリーンによって粗大な固形分が除かれた後、最初沈殿池で懸濁固形分が除去される。その後、活性汚泥曝気槽で生物学的分解を受けて有機汚濁物質は無機化されるとともに微生物が増殖する。微生物を含む懸濁物質は最終沈殿地で沈降濃縮され、上澄み液は消毒後処理水として環境中に放流される。一方、最終沈殿地で重力濃縮された汚泥の一部は返送汚泥として活性汚泥曝気槽に返送される。それ以外の汚泥は、初沈汚泥と混合されて消化槽に送られ、減容化を目的として嫌氣的に消化される。嫌気消化後の汚泥は洗浄された後、凝集剤が添加されて脱水操作を受ける。脱水ケーキは処理場から搬出され、通常は焼却処理された後、焼却灰は埋め立て処分される。

本章では、新潟市中部下水処理場、船見下水処理場より採取した汚泥ケーキならびに余剰汚泥の濾過ケーキを試料として用いた。

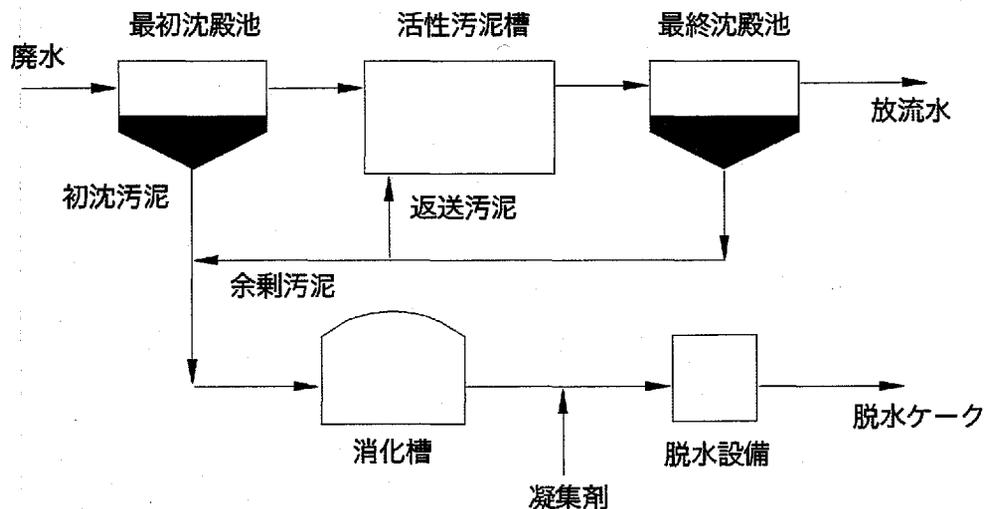


図 6 下水処理場のフロー

中部下水処理場では、無機凝集剤（消石灰、塩化第Ⅱ鉄）を添加した後、フィルタープレスによって濾過・脱水を行っている。一方、船見下水処理場では、高分子凝集剤を添加した後、遠心式デカンターにより脱水を行っている。また、可溶化に及ぼすケーキ含水率の影響を調べるために、余剰汚泥を遠心濃縮した後に加圧濾過を行い、含水率を調整した余剰汚泥濾過ケーキも実験に用いた。

中部下水処理場より採取した脱水ケーキの含水率は約 50%, MLVSS/MLSS は約 30% であった。汚泥ケーキを密閉容器に入れ 4°C (冷蔵庫内) で保存した。試料の保存期間は 1~14 日とした。

余剰汚泥ケーキは、返送汚泥を種汚泥として長期間人工廃水 (グルコース, ペプトン, リン酸 1 カリ, 硫酸アンモニウム) で馴養した汚泥を用いて調整した。余剰汚泥を遠心濃縮 (3000 rpm, 15 min) した後, 加圧濾過して調整した。余剰汚泥ケーキの含水率は約 90%, MLVSS/MLSS は約 68% であった。

可溶化処理を行う前に, ミキサーを用いて脱水ケーキを粉砕し, ふるいを用いて粒径を 600~710  $\mu\text{m}$  にそろえた。

## (2) 凍結融解処理

汚泥ケーキを 50 mL 容ビーカーに入れた。ビーカーを低温恒温槽内に浸漬して 24 時間保持しケーキを凍結させた。その後, 常温で解凍した。凍結温度は -30~-2°C の範囲で変化させた。

## (3) 気泡析出処理

汚泥スラリーの処理に用いた高压容器の出入り口直径が小さいため, ケーキを高压容器に入れることができなかった。そこで, メンブランフィルターの代わりに OHP シートを設置した限外濾過器 (アドバンテック, UHP-25K) を圧力容器として用いた。濾過器内にケーキを入れ, 気相を二酸化炭素ガスで置換するために 5 分間二酸化炭素を供給した。その後容器出口を閉じて容器内を加圧した。圧力はガス容器の圧力調整器を用いて調節した。所定の時間後に容器内を大気圧に開放した。加圧圧力は 0.1~0.5 MPa とした。

## (4) 過酸化水素処理

500 mL 容ビーカーにケーキを入れ, 過酸化水素水 (濃度 30 wt%) を加えた。過酸化水素の添加率は, 余剰汚泥ケーキでは 1.45~14.5 g/g-MLVSS, 脱水ケーキでは 1.47~10.3 g/g-MLVSS とした。

## (5) オゾン処理

実験装置は汚泥スラリーの場合と同様である。スラリーの代わりに脱水ケーキをビーカーに入れ, ビーカーをセパラブルフラスコに入れてオゾンを供給した。オゾン添加率は, 余剰汚泥ケーキで 0.151 g/g-MLVSS, 脱水ケーキで 0.16~0.349 g/g-MLVSS とした。

この場合のオゾン反応量は、余剰汚泥ケーキで 0.079 g/g-MLVSS、脱水ケーキで 0.0936 ~0.283 g/g-MLVSS であった。

#### (6) オートクレーブ処理

シャーレに汚泥ケーキを入れ、オートクレーブ処理を行った。温度は 121°C とし、加熱時間は 2~45 分とした。

#### (7) 分析方法

前処理前後の MLSS, MLVSS, DOC 濃度を測定した。含水率は、含水状態の試料の質量と乾燥後の質量の差から求めた。DOC 濃度の測定は次のようにして行った。汚泥サンプルをビーカーに入れ、蒸留水を 100~300 mL 加え、スターラーバーを用いて 5 分間攪拌し、汚泥を懸濁させた。その後、懸濁液を遠心分離 (10,000 rpm, 15 min, 4°C) し、上澄み液の TOC 濃度を測定した。加えた蒸留水の量と上澄み液の TOC 濃度より、可溶化した有機物量を求めた。

なお、オゾンの分析方法は第 2 章で用いた方法と同じである。

### 3-3 実験結果と考察

#### (1) 可溶化率

図16に、脱水ケーキを対象とした場合のMLVSS量と可溶化有機物量の関係を示す。汚泥スラリーの場合と同様に、凍結融解、気泡析出、過酸化水素、オゾン、オートクレーブいずれの処理においても、可溶化した有機物量はMLVSS量に比例した。それぞれの直線の傾きより、可溶化率 [g-DOC/g-MLVSS] を求めた。

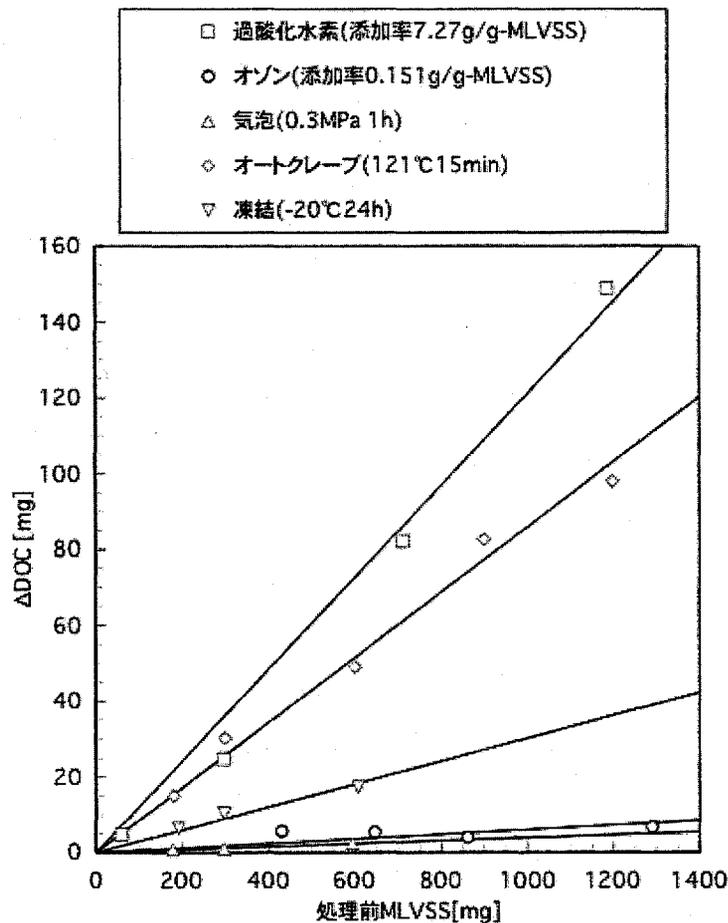


図16 汚泥ケーキの可溶化率

#### (2) 凍結融解処理

図16に余剰汚泥ケーキを対象とした場合の可溶化率に及ぼす凍結温度の影響を示す。また、比較のため図には余剰汚泥スラリーの結果についても示した。凍結温度が $-4^{\circ}\text{C}$ 以上では、汚泥ケーキの表面の一部のみが凍結していることが観察された。しかし、有機物の可溶化は見られなかった。凍結温度が $-5^{\circ}\text{C}$ 以下では、凍結温度が低くなるにつれて可溶化率が増加した。また、可溶化率の値は汚泥ケーキの場合とスラリーの場合で大きな違いはなかった。

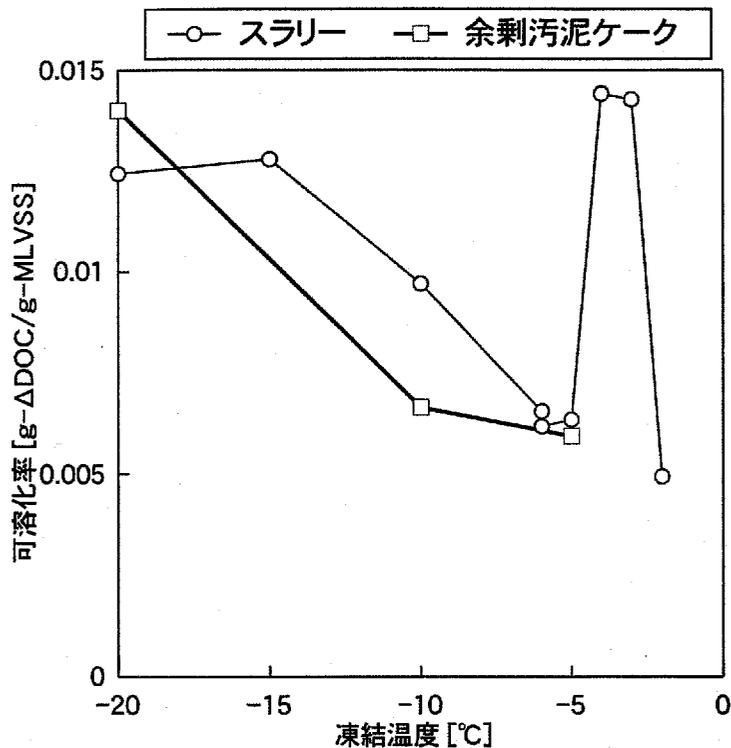


図7 ケークの可溶化率に及ぼす凍結温度の影響

スラリーを対象とした凍結融解処理ではバルク液が凍結した後、あるいは同時に細胞内で凍結が始まると考えられる。このため、細胞内の水が凍結して細胞を破壊すると同時にバルク液の凍結による細胞外部からの機械的歪みによっても細胞壁が破壊されると考えられる。これに対してケーキを対象とした凍結融解では、バルク液の凍結による細胞外からの機械的歪みによる効果は少ないと考えられる。逆に、細胞外には液がほとんど存在しないことから、細胞内部が比較的凍結しやすく、細胞内部の液が凍結して体積が膨張した場合には細胞壁が受ける損傷が大きくなると考えられる。このような効果により、ケーキの可溶化率はスラリーの場合とほぼ同程度であったと思われる。

### (3) 気泡析出処理

図 18 に、汚泥脱水ケーキとスラリーを対象として気泡析出処理を行った場合の可溶化率と保持時間の関係を示す。スラリーの場合、保持時間が約 3 時間以上で可溶化率がほぼ一定になった。これに対して、脱水ケーキの場合、約 1 時間で可溶化率はほぼ一定になり、また可溶化率も高くなった。スラリーでは懸濁液の溶媒 (水) に二酸化炭素が溶解し、溶解した二酸化炭素が菌体内に拡散する。スラリーを圧力容器内で静置したために、スラリーの処理では二酸化炭素が溶解して平衡に達するまでに約 3 時間かかった

ものと考えられる。これに対して、汚泥脱水ケーキでは、菌体外に存在する水の量は少なく、気相中の二酸化炭素が菌体内に溶解しやすいと考えられる。このため、スラリーに比べて脱水ケーキの方が可溶化率が一定値に達するまでの保持時間が短く、可溶化率の値そのものも高くなったものと考えられる。

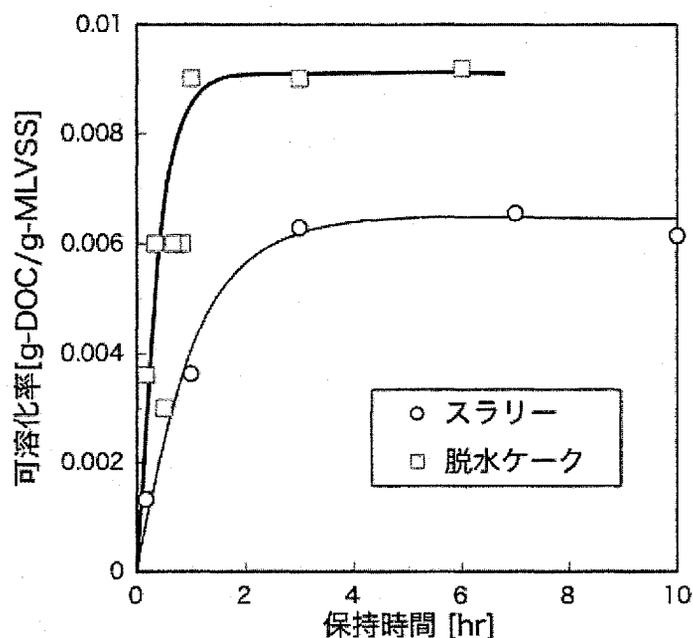


図 18 汚泥ケーキの気泡析出処理における可溶化率と保持時間の関係

図 19 に可溶化率と圧力の関係を示す。加圧圧力が同じでも、脱水ケーキの可溶化率がスラリーに比べて高かった。また、脱水ケーキとスラリーの可溶化率の差は、圧力が 0.2 MPa 以上ではほとんど同じであった。この結果も、汚泥脱水ケーキの方が菌体外部に存在する水の量が少ないために、二酸化炭素が菌体内に溶解しやすくなり、圧力を大気圧に開放した際により多くの二酸化炭素がマイクロ気泡として析出することで説明できる。

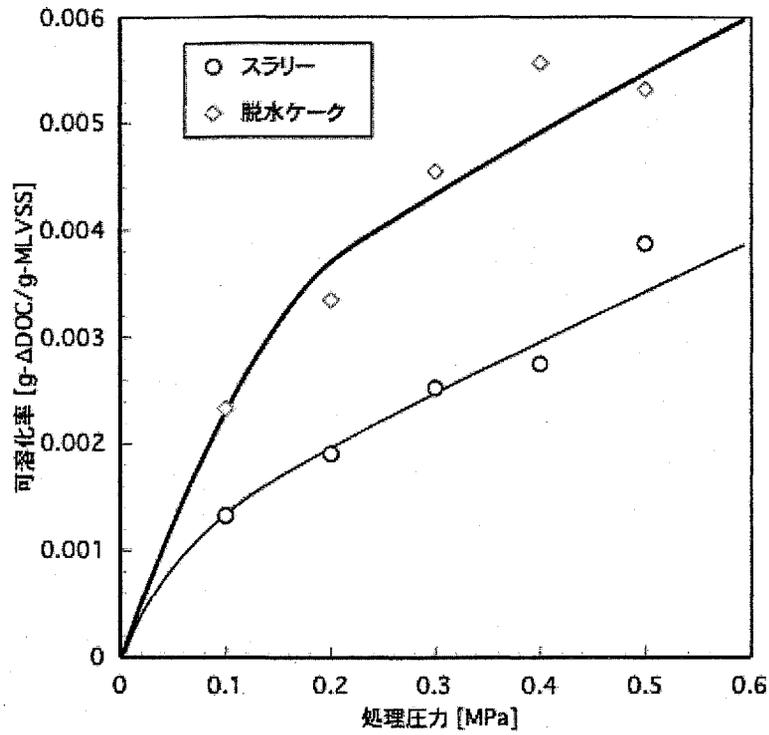


図 19 気泡析出処理における可溶化率と圧力の関係

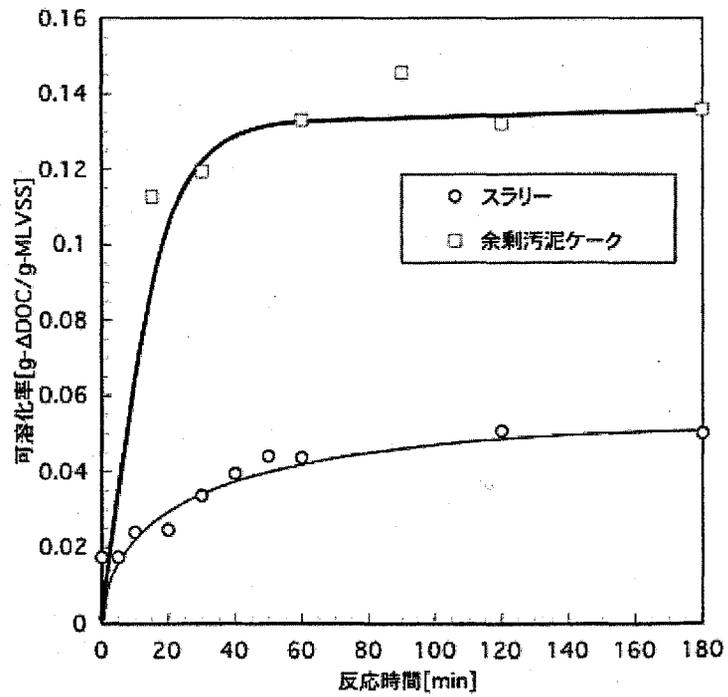


図 20 過酸化水素処理における反応時間と可溶化率の関係

#### (4) 過酸化水素処理

図 20 に過酸化水素処理における反応時間と可溶化率の関係を示す。汚泥スラリーの場合では、1 時間程度までは反応時間とともに可溶化率は増加し、1 時間以上ではほぼ一定になった。これに対して、汚泥ケーキの場合には 30 分程度で可溶化率がほぼ一定に達した。過酸化水素処理によるケーキの可溶化率も 13%程度とスラリーの場合と比較して 2 倍以上大きくなった。過酸化水素処理では、粉碎して粒度をそろえた活性汚泥脱水ケーキに、30 wt%過酸化水素水を添加した。従って、過酸化水素処理では脱水ケーキに水を加えることになる。スラリーの場合には、溶媒（水）によって過酸化水素が希釈されることや、溶媒中に溶解している有機物や無機物により過酸化水素が消費される可能性がある。これに対して、汚泥ケーキの場合には過酸化水素が直接菌体に作用するため可溶化率が高くなったものと考えられる。

#### (5) オゾン処理

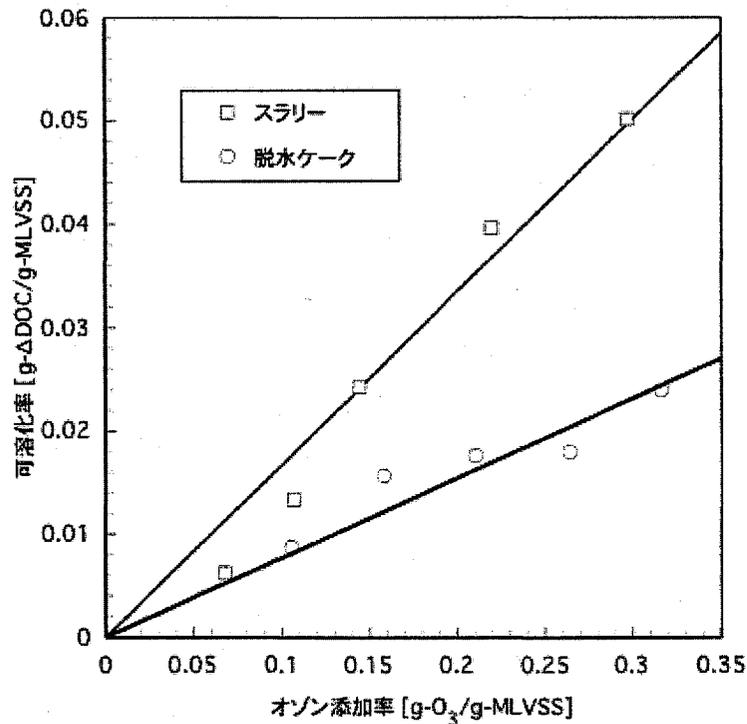


図 21 オゾン処理における可溶化率

図 21 にオゾン添加率と可溶化率の関係を示す。汚泥スラリー、脱水ケーキの場合とも、可溶化率はオゾン添加率に比例して増加した。しかし、オゾン添加率が同じ場合、スラリーの場合よりも脱水ケーキの可溶化率が低かった。過酸化水素処理の場合と同様

に、オゾン処理でもオゾンが菌体細胞壁と直接反応すると考えられるために可溶化率が高くなると予想した。一方、オゾンの反応率は汚泥スラリーの場合が約 60%、脱水ケーキの場合が約 76%であり、脱水ケーキの方が反応したオゾン量が多いことがわかった。つまり、脱水ケーキはオゾン消費量が多いにもかかわらず可溶化率が低くなった。この理由は不明であるが、オゾン処理は脱水ケーキを対象とした可溶化前処理としては不適切であると思われる。

### (6) オートクレーブ処理

図 22 に、オートクレーブ処理における保持時間と可溶化率の関係を示す。脱水ケーキでは保持時間が 30 分以上で可溶化率が一定になることが分かった。また、可溶化率の値は、スラリーの場合の約 40%であった。

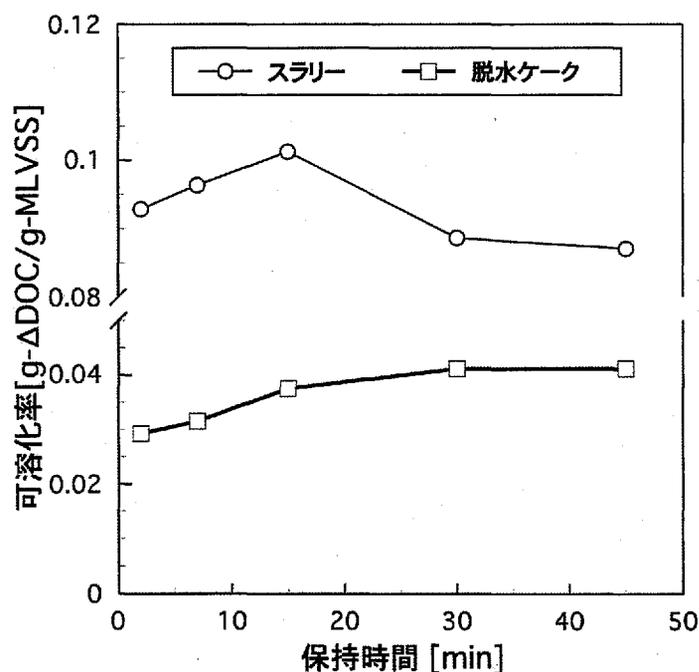


図 22 汚泥ケーキのオートクレーブ処理

### (7) 可溶化率に及ぼす含水率の影響

汚泥スラリーの固形分濃度は数%である。逆に、含水率から見ると汚泥スラリーの含水率は 99%以上となる。余剰汚泥スラリーを濾過したケーキの含水率は約 90%であった。新潟市下水処理場より採取した脱水汚泥の含水率は 50~70%の範囲にあった。汚泥ケーキの可溶化方法を検討する場合、汚泥ケーキの可溶化率に及ぼす含水率の影響を明

らかにする必要がある。そこで、汚泥スラリー、余剰汚泥濾過ケーキ、下水処理場脱水ケーキ（無機凝集剤+フィルタープレス）に対して行った前処理の効果を含水率を指標として整理し直した。

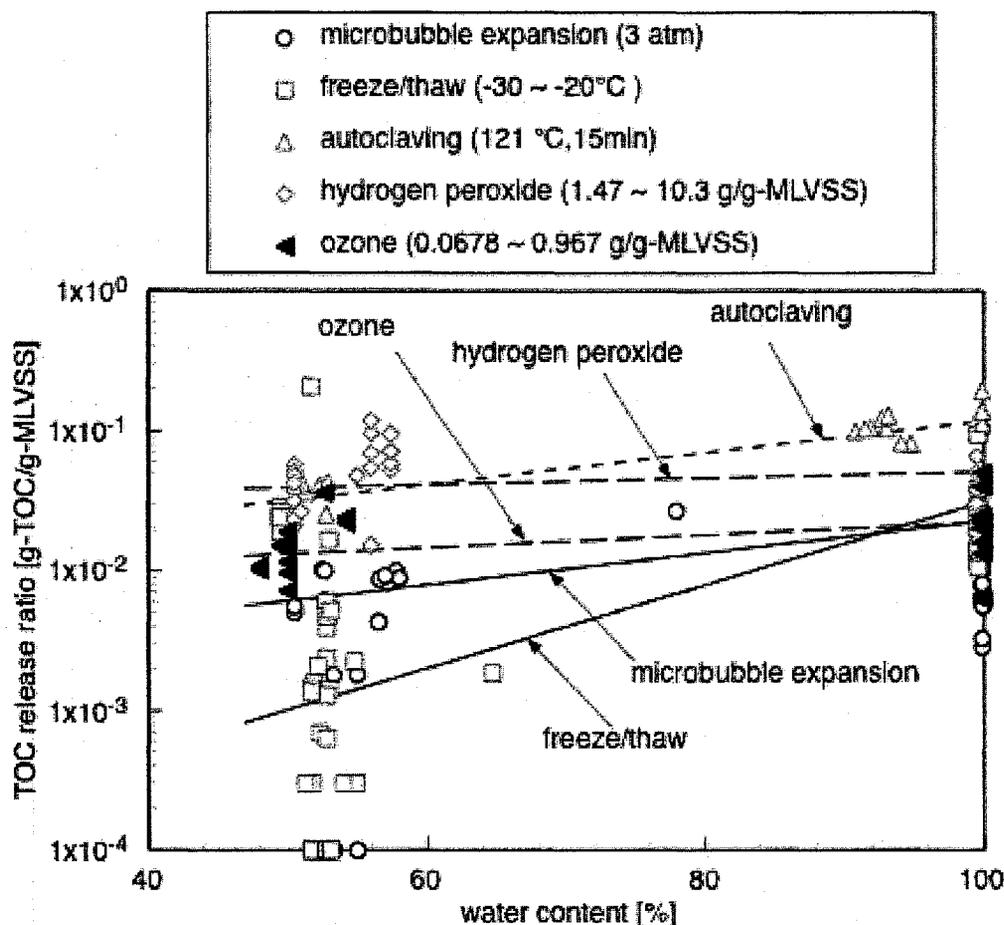


図 23 可溶化率と汚泥含水率の関係

図 23 に各種前処理による可溶化率と含水率の関係を示す。汚泥スラリーを対象とした場合、オートクレーブ処理の可溶化率が最も高かった。データにばらつきが見られるが、汚泥ケーキの含水率が低下するとともに一般に可溶化率は低下した。オートクレーブ処理の場合には、可溶化率の含水率依存性はやや強く、含水率が 50%程度に低下すると可溶化率はほぼ半分になった。過酸化水素処理では、図 20 に示されるように、汚泥スラリーと余剰汚泥濾過ケーキではケーキの可溶化率が高くなった。しかし、脱水ケーキの場合には、可溶化率が約 5%であり、スラリーの場合と大きな差はなかった。つまり、過酸化水素処理による可溶化率は汚泥の含水率にはほとんど影響されなかった。過酸化水素処理では、粉碎した汚泥ケーキ粒子に濃度 30 wt%の過酸化水素水を添加する。

このため、処理と同時に水が添加されることになる。すなわち、過酸化水素処理では、脱水ケーキ自体の含水率に関わらず、必然的に水が加えられることになる。従って、過酸化水素処理では可溶化率が汚泥の含水率に依存しにくいものと考えられる。オゾン処理における可溶化率に及ぼす汚泥含水率の影響、すなわち含水率に対する可溶化率の依存性は、過酸化水素処理の場合とほぼ同じであった。オゾン処理も汚泥含水率の影響を受けにくいことがわかった。オゾンは難溶解性ガスであることから、オゾンが菌体細胞壁を攻撃するプロセスでは、溶存態のオゾンよりもガス状のオゾンが直接作用するほうが可溶化に効果的であると考えられる。このため、オゾン処理による有機物の可溶化は、汚泥ケーキの含水率にはあまり左右されなかったものと思われる。

気泡析出処理による可溶化率の汚泥含水率に対する依存性は、オートクレーブ処理の場合とほぼ等しかった。気泡析出では、細胞外のバルクに溶解するガスは、菌体の破壊にはほとんど寄与しないであろう。細胞内に溶解するガス量が多いほど可溶化率が高くなると予想される。汚泥スラリーよりも汚泥ケーキの方がバルク水の量が少なく、気相中の二酸化炭素が比較的容易に菌体内部に溶解・拡散すると思われる。一方、汚泥の含水率が少なくなれば、細胞内部の塩濃度が増加し、二酸化炭素の飽和濃度が低下する可能性がある。オゾンではガス状のまま細胞壁を酸化させることができるが、気泡析出処理ではガスが細胞内に溶解する必要がある。気泡析出処理では、汚泥含水率の低下により、移動速度の増加と飽和濃度の低下という2つの相反する効果が働いているために、可溶化率の含水率依存性がオゾン処理よりも高くなったものと考えられる。

凍結融解処理では、 $-20^{\circ}\text{C}$ に脱水ケーキを保持しても明らかに凍結している状態を目視で確認することはできなかった。そのため、凍結温度を $-30^{\circ}\text{C}$ まで低下させて処理を行った。汚泥脱水ケーキの可溶化率は余剰汚泥スラリーに比べて大きく低下した。凍結融解処理では、菌体内部の水が凍結する必要がある。菌体内部の含水率が低下すれば、細胞内部の束縛水の割合が増えて自由水の割合が低下する。このため、菌体内部で凍結することのできる水の量が減少し、凍結による細胞破壊効果が減少したと考えられる。

汚泥ケーキを対象とした前処理方法では、熱的処理の可溶化率が高く、ついで化学的方法（過酸化水素処理、オゾン酸化処理）の可溶化率が高かった。機械的前処理（気泡析出、凍結融解）の可溶化率は低く、汚泥含水率の影響を受けやすいことがわかった。

### 3-4 まとめ

汚泥脱水ケーキを対象として、資化性を向上させるための前処理の効果を可溶化率を指標として検討した。菌体細胞壁の破壊処理として検討した前処理方法は、凍結融解、気泡析出、過酸化水素酸化、オゾン酸化、オートクレーブ処理である。

凍結融解処理では、汚泥ケーキ含水率の低下とともに可溶化率が大きく低下した。また、気泡析出処理も可溶化率がケーキ含水率とともに低下した。これらの機械的処理では、細胞内で氷結晶が成長する、あるいは、細胞内の溶存二酸化炭素濃度が高くなる必要がある。汚泥ケーキの含水率が減少するとともに、細胞内の自由水量が減少し、凍結や気泡析出の効果が現れにくくなったものと考えられる。

過酸化水素処理では、可溶化率は汚泥ケーキ含水率にほとんど依存しなかった。この理由として、過酸化水素処理では、濃度 30 wt%の水溶液の形で過酸化水素を汚泥ケーキに加えるため、汚泥ケーキに含まれる水量よりも過酸化水素水によって供給される水量が多い。このため見かけ上汚泥ケーキの含水率が可溶化率にほとんど影響しなかったと考えられる。一方、オゾン処理における可溶化率のケーキ含水率依存性は、気泡析出処理の場合に比べてやや低かった。オゾン処理では、溶存オゾンが菌体細胞壁を外側から酸化することで細胞壁に損傷を与え、可溶化が行われると考えられる。オゾン処理の場合には、気泡析出の場合と異なり、オゾンが細胞内部に拡散する必要はない。また、溶存オゾン以外にも気相から直接オゾンが反応する可能性がある。これらの理由により、オゾン処理における可溶化率は、ケーキの含水率が低下するに伴って減少するが、気泡析出よりは含水率の影響を受けにくいと推察される。

オートクレーブ処理では、可溶化率のケーキ含水率に対する依存性は気泡析出処理の場合とほぼ同じであった。オートクレーブ処理では水蒸気により加熱が行われる。汚泥は水蒸気に接しているために、汚泥ケーキが乾燥していたとしても、スチームから水分が補給される。このために、可溶化率の含水率依存性は弱いと予想された。しかし、可溶化率の含水率依存性は比較的強いことがわかった。

一方、可溶化率の大きさとしては、加熱処理（オートクレーブ処理）が最も高く、次に化学的酸化処理（過酸化水素処理、オゾン酸化処理）が続いた。機械的処理（気泡析出、凍結融解）の可溶化率が最も低かった。

可溶化率の結果は、溶存態となった有機物の割合である。菌体を構成する有機物質が完全に溶出しなくても、前処理した菌体の有機物質を *Bacillus thuringiensis* が資化しやすくなれば目的は達成される。従って、可溶化率に加えて、対象とする微生物の増殖や目的生産物の生産性を検討する必要がある。

## 第4章 余剰汚泥スラリーを基質としたバイオ殺虫剤の生産

### 4-1 緒言

余剰汚泥を基質としてバイオ殺虫剤を生産する場合、汚泥の利用方法として余剰汚泥スラリーを用いる液体培養と脱水ケーキを用いる固体培養が考えられる。余剰汚泥スラリーによる液体培養では、汚泥菌体固形分を含めた有機物濃度は固体培養に比べて低いものの、攪拌による混合が容易であり、温度や pH、DO 濃度などの培養環境を制御し易いという利点がある。

本章では、固体培養を行う場合の基礎的な知見を得ることを目的として、余剰汚泥スラリーを用いた *Bacillus thuringiensis* の増殖ならびに胞子形成について検討した。*Bacillus thuringiensis* は好気性の桿菌であり、胞子形成時に殺虫性を有する結晶性封入体を生産する。*B. thuringiensis* の菌体数や菌体濃度の経時変化より増殖速度を検討することは比較的容易である。しかし、バイオ殺虫剤生産の直接的な指標となる殺虫毒性の評価は煩雑であり専門的な技能を必要とする。例えば、鱗翅目幼虫に対する殺虫性を評価するためには、まず標的となる幼虫を飼育し、各処理群に分けた幼虫に対して培養液あるいは精製液を噴霧して生存数や死滅数を計数する必要がある。また、鞘翅目幼虫（地虫）に対する殺虫性毒素の有効性を評価するためには、標的昆虫の卵を集めて、孵化数や（幼虫の生存数／死滅数）などを計数する必要がある。本研究では、地虫に対して特異的に作用する殺虫性毒素を生産する菌株である *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui を用いた。本菌の生産する殺虫性毒素の有効性を評価するためには上述のようなバイオアッセイが必要であるが、胞子形成数が殺虫性毒素の生産と関連することから、本研究では簡便法として胞子形成数を指標としてバイオ殺虫剤の生産性を検討することとした。

余剰汚泥スラリーを対象とした細胞壁破壊処理としては、凍結融解、気泡析出、超音波、過酸化水素酸化、オゾン酸化を取り上げた。なお、船見下水処理場の余剰汚泥については、マイクロ波加熱も検討した。前処理をした汚泥スラリーを基質として *B. thuringiensis* の培養を行い、胞子濃度に及ぼす前処理の効果について検討した。

## 4-2 実験方法

### (1) 菌株

菌株として、地虫に対して特異的に作用する殺虫性毒素を生産する菌株である *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui を用いた。本菌を NYS 寒天培地で培養(30℃, 24時間)した。その後、冷蔵庫内(4℃)で保存した。継代培養を行う場合には、コロニー中の菌の形態を顕微鏡観察し、雑菌汚染のないことを確認した。

NYS 寒天培地上に増殖したコロニーから白金耳を用いて菌を採取し、生理食塩水に懸濁させて菌懸濁液を調製した。

### (2) 余剰汚泥スラリー

新潟市中部下水処理場ならびに船見下水処理場より、標準活性汚泥法における返送汚泥を試料として採取した。

### (3) 可溶化前処理

それぞれの前処理条件は下記の通りである。

- ・凍結融解処理 凍結温度：-20℃, 保持時間：24時間
- ・気泡析出処理 加圧圧力：0.3 MPa, 保持時間：3時間
- ・超音波処理 出力：3 W, 照射時間：20分, 処理体積 40 mL
- ・過酸化水素処理 過酸化水素濃度：30%, 添加率：1.4~2.3 g/g-MLVSS,  
反応時間：120分
- ・オゾン酸化処理 オゾンガス流量 100 mL/min, 添加率：0.44~2.3 g/g-MLVSS  
入口オゾン濃度 1.09%

汚泥スラリーに対して各前処理を行い、DOC 濃度を測定した。その後、オートクレーブ(121℃, 15分)により殺菌を行い、さらに殺菌操作後の DOC 濃度を測定した。前処理として“オートクレーブ処理”と記す場合には、余剰汚泥スラリーを直接オートクレーブ処理して植菌した場合、すなわち、前処理なしで殺菌操作のみを行った場合に相当する。

### (4) 菌の計数方法

菌懸濁液を 0.85%生理食塩水で希釈して細菌用血球計算盤(目盛標線幅 0.05 mm, 目盛面深度 0.02 mm)を用いて菌体数, 孢子数を位相差顕微鏡下で計数した。*B. thuringiensis* は桿菌であり、孢子はほぼ球形であるので、*B. thuringiensis* の純粋培養系では顕微鏡下

で観察することは比較的容易であった。図 24 に位相差顕微鏡写真の一例を示す。しかし、汚泥スラリーの場合には、汚泥フロックの破片と胞子の区別がつきにくく、正確な計測が困難であった。そこで、胞子濃度の測定をより正確に行うためにコロニー平板法を採用した。



図 24 *B. thuringiensis* の顕微鏡写真

サンプリング試料を生理食塩水で連続希釈し、NYS 寒天平板培地に 0.1 mL 塗布した。このシャーレを 30°C、24 時間恒温槽内で培養し、出現したコロニー数を計数した。ここで、栄養細胞と胞子を含む懸濁液を平板培地に塗布して培養を行った場合、出現したコロニーが栄養細胞由来か胞子由来かを区別することはできない。そこで、培養液を低温殺菌（75°C、15 分）し栄養細胞のみを死滅させてから培養液を塗布してコロニーを形成させることによって胞子濃度を測定することを試みた。しかし、再現性のある測定結果は得られず、低温殺菌後のコロニー数が殺菌前よりも多くなる場合があった。この理由としては、低温殺菌において栄養細胞にヒートショックが加わり、これによって胞子の形成が促進された可能性がある。このため、低温殺菌により栄養細胞のみを死滅させる方法を行わず、栄養細胞と胞子を区別しないで平板寒天培地に塗布して、出現したコロニーを、菌体・胞子濃度として表した。

## (5) 培養方法

*B. thuringiensis* は好気性菌であること、前処理した汚泥スラリー (= 基質) が少量でよいことから、L字試験管を用いる揺動振盪による培養を最初に試みた。

### ・揺動振盪培養

前処理を行った汚泥スラリーに、1 N 塩酸あるいは(1/2) 規定水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 6.95~7.05 の範囲に調節した。その後、スラリー (= 基質) をオートクレーブで加熱殺菌 (121°C, 15 分) した。殺菌したスラリーを 7 mL ずつ L 字型試験管に分注した。*B. thuringiensis* 懸濁液の菌数を細菌用計数盤を用いて計数し、孢子濃度が 1000 個/mL となるように植菌した。揺動速度を 180 cpm (cycles per minute) とし、暗条件で振盪した。

一例として、菌体濃度、孢子濃度を細菌用計数盤を用いて測定した培養経過を図 25, 26 に示す。

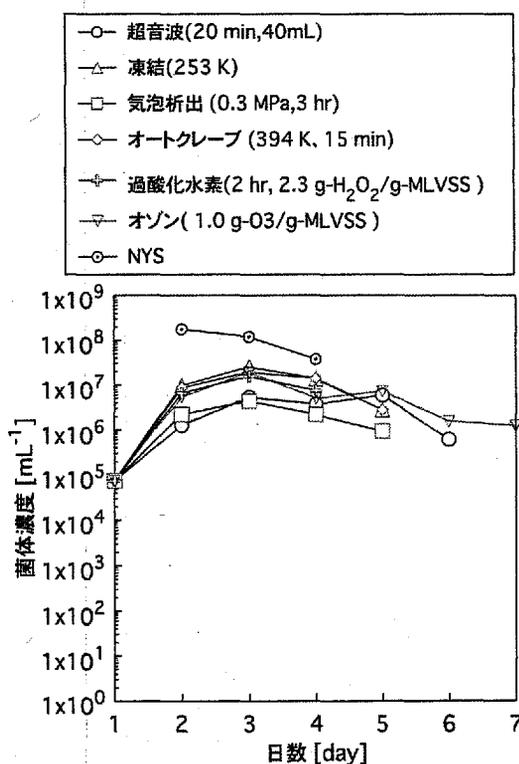


図 25 菌体濃度の経時変化

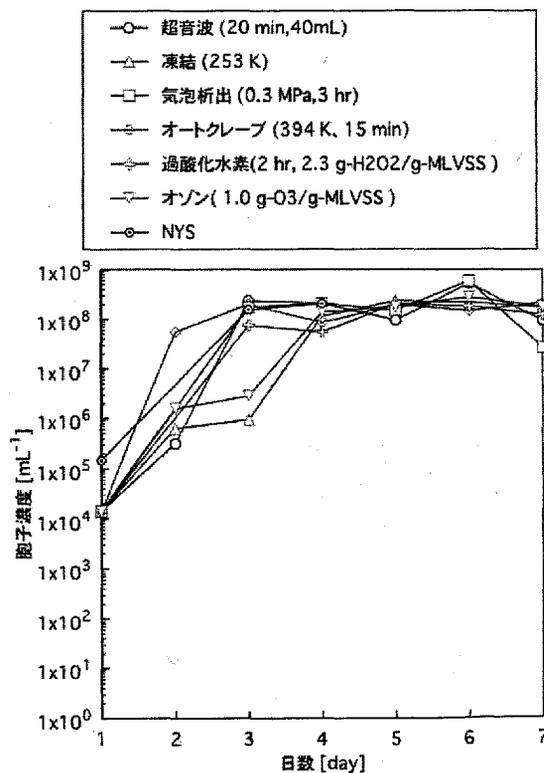


図 26 孢子濃度の経時変化

菌体濃度はいずれの汚泥スラリー培養系についても 3 日目に最大となり、その後は徐々に低下した。NYS 培地では菌体濃度が 2 日目に最大に達した。一方、汚泥スラリーを凍結、気泡析出、過酸化水素処理した培地では 3 日目に菌体濃度が最大になった。

超音波、オゾン酸化したスラリーでは5日目程度に最大菌体数に達する傾向が見られた。最大菌体濃度は、NYS 培地では  $10^8$  cells/mL であったが、汚泥スラリー培地では  $10^7$  cells/mL のオーダーであった。一方、孢子濃度に関しては、NYS 培地、汚泥スラリー培地で大きな差は認められなかった。この結果の原因として2つの可能性が考えられる。一つ目は、*B. thuringiensis* の増殖ならびに孢子形成がスラリー前処理に依存しないことであり、二つ目は *B. thuringiensis* の増殖が例えば酸素移動や pH など汚泥スラリー前処理以外の因子により制限を受けたことである。培養期間中の pH、温度は適正な範囲にあったことから、酸素移動が律速となっているかを検討した。

#### ・振盪培養

pH 調整した汚泥スラリーを殺菌し (121°C, 15 分), 40 mL ずつ 100 mL 容坂口フラスコに入れた。*B. thuringiensis* 懸濁液の孢子濃度を計測し、初発孢子濃度が  $1.42 \times 10^4$  CFU/mL となるように植菌した。往復振盪機を用いて、振盪速度 165 strokes/min, 30°C で培養した。

### 4-3 実験結果と考察

#### (1) 振盪培養における Bt 菌の増殖

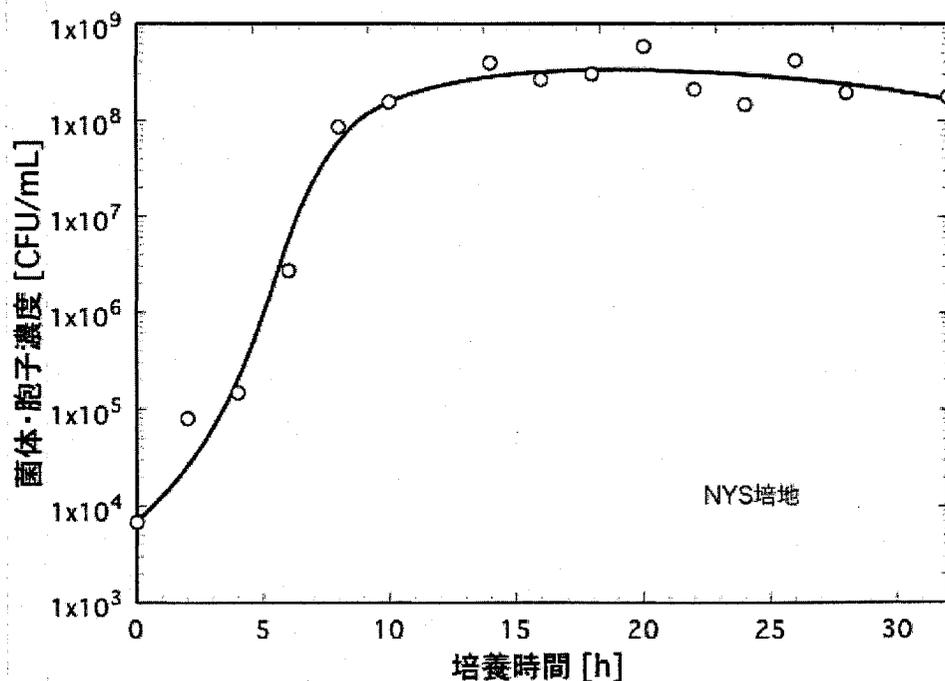


図 27 NYS 培地における Bt 菌の増殖特性

図 27 に、NYS 栄養培地を用いて Bt 菌の振盪培養を行った結果を示す。培養後 4 時

間から7時間程度の期間は対数増殖期に相当した。菌体濃度は約15時間で最大菌体・孢子濃度に達した。菌体濃度は32時間程度までほぼ最大濃度と同程度であった。振盪ばいようでは、揺動培養の結果と比較して、最大菌体・孢子濃度に達するまでの時間が短くなった。このことは、振盪培養における増殖速度が揺動培養よりも高いことを示しており、その原因として、制限基質の濃度が高くなっていることが考えられる。揺動培養、振盪培養ともに培地としてNYS培地を用いていることから、炭素源や窒素源が制限基質となっているとは考えにくい。2つの培養方法で主に濃度が異なっていると考えられる基質は酸素である。つまり、揺動培養に比べて振盪培養では培養液中の酸素濃度をより高く維持できるために、Bt菌の増殖速度が高くなったものと考えられる。すなわち、培養方法を揺動から振動に変えることにより、酸素の供給が制限となることなくBt菌の培養が可能になったものと考えられる。この結果より、Bt菌の液体培養は振盪培養が望ましいと判断される。

## (2) 余剰汚泥スラリーを用いたBt菌の培養

### (中部処理場の汚泥スラリーを用いた場合)

中部下水処理場の返送汚泥を試料として用いて振盪培養を行った場合、直接計数法により測定した菌体・孢子濃度の経時変化は前処理にかかわらず同様であった。各前処理を行ったスラリーを培地として用いた場合、平板コロニー法により測定した菌体・孢子濃度の最大値を図28に示す。この図において、希釈倍率の設定が不適切で菌体の分散が不十分であったためと思われるが、菌体・孢子濃度の値としては妥当な値ではない(例えば大きさが $1 \times 5 \mu\text{m}$ の桿菌の体積は約 $4 \times 10^{-12}$  mLであり、菌体がすきまなく充填している状態の菌体濃度は約 $2.5 \times 10^{11}$  個/mLとなる。従って、このオーダー以上の菌体濃度は理論的にあり得ない)。しかし、実験値にはこのような誤差が含まれているため、値そのものを比較することはできないが、相対的な多さあるいは少なさを比較することはできると考えられる。図中、NYSは細菌の増殖用栄養培地であるNYS培地を用いた場合の結果である。最大孢子菌体濃度は、超音波処理とオゾン処理で低く、過酸化水素ならびにオートクレーブ処理がNYS培地の場合よりもやや低かった。また、気泡析出処理はNYS培地の場合と同程度であった。凍結融解処理を行った場合の最大孢子濃度はNYS培地の場合よりも高くなった。先にも述べたように測定値を直接比較することはできないが、超音波処理とオゾン処理では、他の処理方法に比べて、孢子・菌体濃度が低くなる傾向が見られる。また、過酸化水素処理でも孢子・菌体濃度はオートクレーブ処理と比較してやや低い傾向にあった。第3章で示したように、余剰汚泥スラリーを処理対象とした場合の可溶化率は、オゾンや過酸化水素、超音波では他の前処理方法に比

べて高い傾向にあった。すなわち、可溶化率が高い傾向にある前処理方法では逆に孢子・菌体濃度が低くなる傾向が認められる。一般にオゾン処理や過酸化水素処理では酸化剤（オゾンあるいは過酸化水素）の酸化力が強い。また、超音波処理では局所的にかなりの高温になる。これらのことから、オゾン酸化、過酸化水素処理、超音波処理では、細胞壁に損傷を与えて可溶化を促進する効果も高いが、同時に、Bt 菌の増殖あるいは孢子形成に対して何らかの阻害効果を持っているのではないかと推察される。

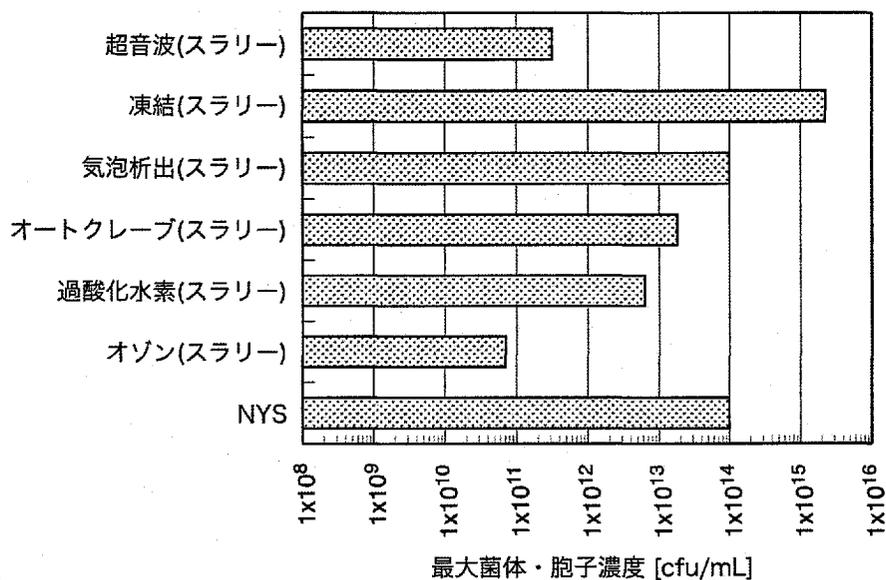


図 28 最大菌体・孢子濃度に及ぼす前処理の効果（中部）

これに対して、気泡析出処理、凍結融解処理ではオートクレーブ処理と比較して、最大菌体・孢子濃度は高い傾向にあった。気泡析出処理は常温で処理が進行し、高温スポットが発生する可能性もない。また、凍結融解処理は常温以下で処理が行われる。これらの処理はいずれも熱変性の可能性はない。気泡析出、凍結融解処理で、Bt 菌の増殖・孢子形成に対して阻害のある化合物は生成しにくいと考えられる。

#### 船見処理場の汚泥スラリーを用いた場合

船見処理場より採取した返送汚泥を前処理して Bt 菌を培養した。Bt 菌の増殖経過を図 2) に示す。この場合、前処理として、気泡析出、凍結融解、オートクレーブ、オゾン、過酸化水素、超音波処理に加えて、マイクロ波加熱を検討した。図中、“未処理”はオートクレーブによる殺菌のみの場合を示す。その他の前処理では、汚泥スラリーに前処理を行った後にオートクレーブによる加熱殺菌を行った。オートクレーブのみ（未処理）の場合、約 0.7 d で菌体・孢子濃度は最大に達した。菌体・孢子濃度は 1 日目以

後にやや減少するものの、2日目以降はほとんど変化が見られなかった。マイクロ波加熱では1日後に菌体・孢子濃度が最大値に達した。マイクロ波加熱以外の前処理では0.7日目に菌体・孢子濃度が最大値に達した。また、未処理（オートクレーブのみ）、凍結融解、マイクロ波加熱、気泡析出では2日目以降で菌体・孢子濃度の減少は認められなかった。これに対して、過酸化水素処理、オゾン酸化処理、超音波処理では、2日以降も菌体・孢子濃度は減少した。菌体・孢子濃度が最大値に達した後に減少する傾向が前処理によって異なる理由は不明であるが、培地中の栄養素が枯渇することに加えて、Bt 菌の増殖に対して阻害的な効果を有する物質が前処理によって生成した可能性が考えられる。

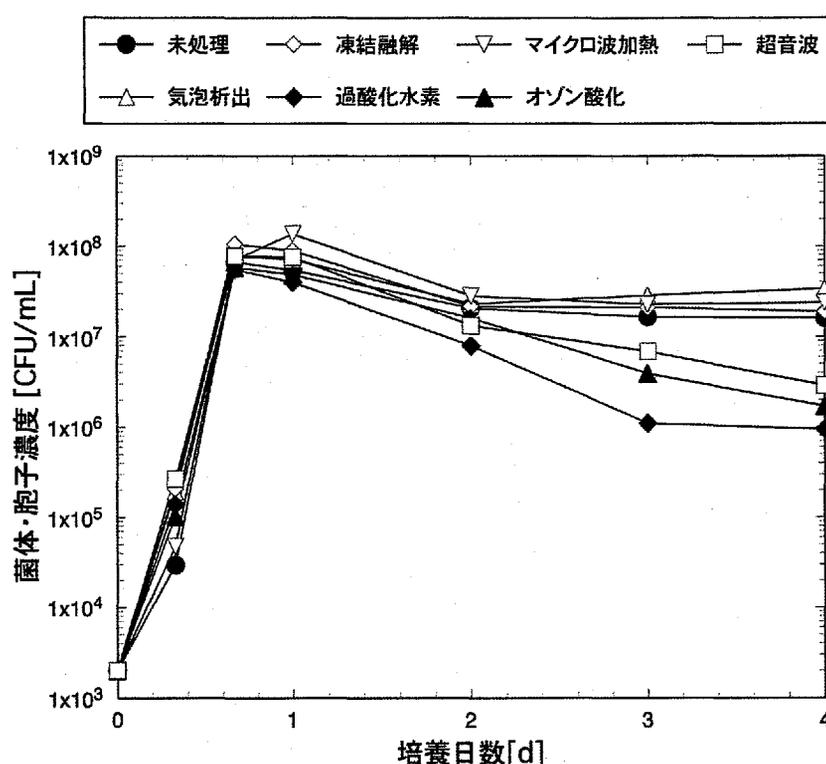


図 29 Bt 菌の培養経過（船見処理場スラリー）

図 30 に最大菌体・孢子濃度に及ぼす前処理の影響をまとめて示す。オートクレーブ処理のみ（前処理なし＝未処理）の場合を基準として、前処理の効果を比較する。気泡析出処理ならびにマイクロ波加熱処理では未処理の場合に比べて Bt 菌増殖の促進効果が明らかに認められた。凍結融解処理汚泥スラリーを用いた場合の菌体・孢子濃度は未処理の場合とほぼ同じであった。一方、超音波処理、オゾン処理、過酸化水素処理では逆に最大菌体・孢子濃度が未処理の場合よりも低下した。

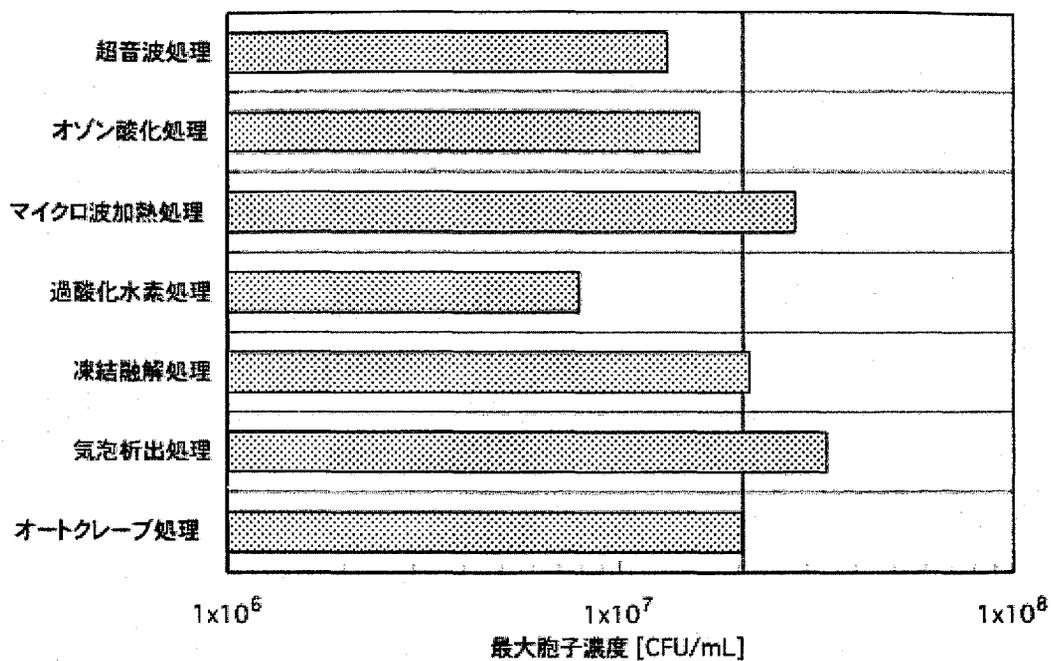


図 30 最大菌体・孢子濃度に及ぼす前処理の影響

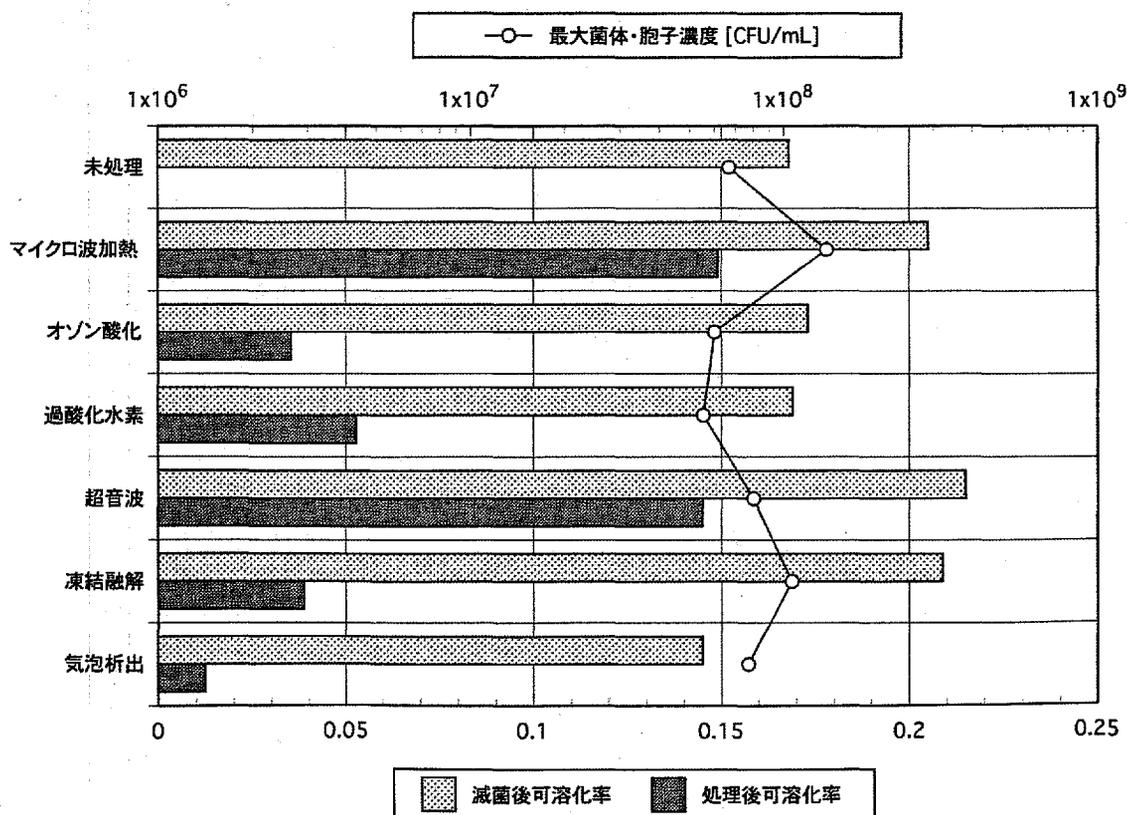


図 31 最大菌体・孢子濃度および可溶化率の関係

図 31 に、最大菌体・孢子濃度と前処理後の可溶化率、滅菌後（前処理+加熱殺菌）の可溶化率をまとめて示す。最大菌体・孢子濃度の高かったマイクロ波加熱処理では処理後可溶化率、滅菌後可溶化率ともに高かった。しかし、凍結融解処理では滅菌後可溶化率は高いものの処理後可溶化率は比較的低かった。また、オゾン酸化や過酸化酸素処理では最大菌体・孢子濃度が低かった。これらの処理では滅菌後可溶化率は比較的低いものの、処理後可溶化率は逆に他の処理方法に比べて高かった。

可溶化率と最大菌体・孢子濃度の相関性を調べるために、図 32 にそれらの相関性を示す。データの量が少ないために比較が困難であるが、気泡析出、凍結融解、超音波、マイクロ波加熱では、前処理後可溶化率と菌体孢子濃度には正の相関が認められる。これに対して、過酸化水素とオゾン処理では可溶化率と菌体孢子濃度には正の相関が認められなかった。気泡析出、凍結融解、マイクロ波加熱などの前処理では可溶化に伴って余剰汚泥の資化性が高まったと考えられる。これに対して、過酸化水素やおぞん処理では可溶化率は比較的高いものの、余剰汚泥の資化性にはあまり寄与していないことが示された。これは、過酸化水素あるいはオゾンの酸化力が強いために、Bt 菌の生育によって阻害作用のある物質が副成したことを示唆すると考えられる。

- 1 未処理, 2 気泡析出, 3 凍結融解, 4 超音波  
5 過酸化水素, 6 オゾン, 7 マイクロ波加熱

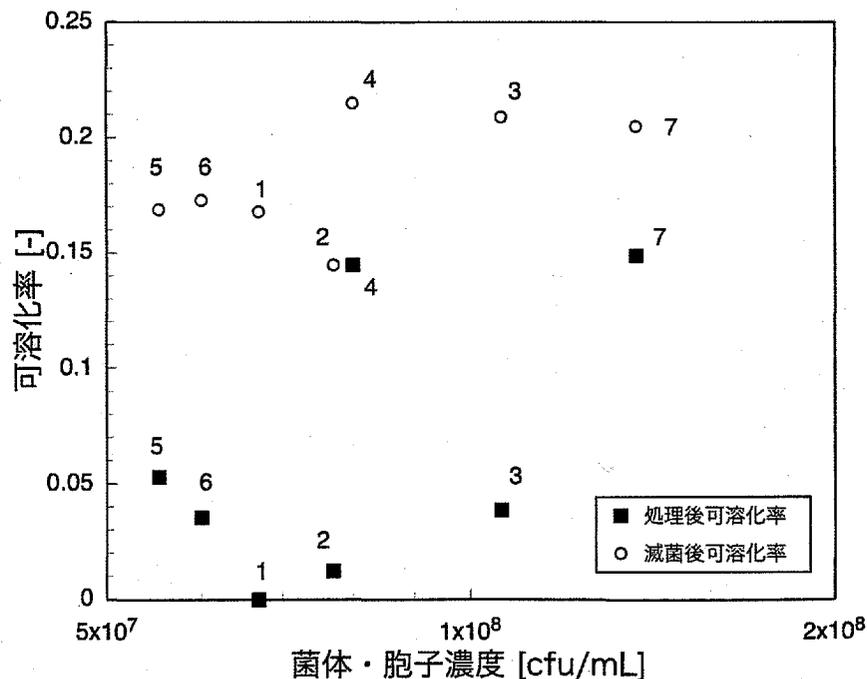


図 32 可溶化率と菌体孢子濃度の関係

#### 4-4 まとめ

下水を対象とした標準活性汚泥法の余剰汚泥に各種の前処理を行って、Bt 菌の培養を行った。前処理方法としては、気泡析出、凍結融解、超音波、マイクロ波加熱、オゾン酸化、過酸化水素酸化などを取り上げた。前処理した汚泥スラリーをオートクレーブにより加熱殺菌し、Bt 菌の基質として用いた。

気泡析出、凍結融解処理では汚泥の可溶化率はわずかであったが、未処理の余剰汚泥スラリーに比べて最大菌体胞子濃度が増加した。また、マイクロ波加熱処理では、可溶化率、最大菌体胞子濃度ともに高かった。すなわち、余剰汚泥スラリーを基質として Bt 菌の培養が可能であり、前処理によって最大菌体胞子濃度を高めることが可能であることを確認した。

なお、前処理方法としてオゾン酸化あるいは過酸化水素処理を行った場合には、最大菌体胞子濃度が未処理の場合よりも低下する傾向にあった。この理由として強力な酸化剤により Bt 菌の増殖に阻害作用のある物質が副成した可能性があげられる。

## 第5章 汚泥脱水ケーキをを基質としたバイオ殺虫剤の生産

### 5-1 緒言

第4章では余剰汚泥スラリーを基質としてバイオ殺虫剤を生産する *Bacillus thuringiensis* の培養が可能であることを明らかにした。しかし、余剰汚泥スラリーの固体濃度は2%程度であり、Bt菌の基質となる有機物濃度は通常の微生物培養の基質濃度に比べて低い。培養液あたりの生産物濃度を高めるためには、培地中の基質濃度を高める必要がある。余剰汚泥を嫌気消化するためにさらに濃縮操作を行った場合でも、固体濃度は通常4%程度である。汚泥スラリーを基質とした液体培養では、攪拌混合により培養液のpH、温度、溶存酸素濃度などを均一に制御しやすい。しかし、汚泥スラリーを用いた液体培養では、有機物濃度が通常の培養に比べて低い、培養廃液が発生し、その処理が必要となるなどの欠点がある。先に述べたように、汚泥脱水ケーキの有機物濃度はスラリーに比べてかなり大きい。脱水ケーキを基質とした固体培養によりBt菌を培養し、バイオ殺虫剤を生産できれば、汚泥の減量化ならびに再利用に大きく寄与できるものと期待される。また、培養後の固体培養物をそのまま堆肥と混合することで、堆肥に对地虫性という機能を付与することができる。この場合には、生産物であるバイオ殺虫剤を分離する必要はなく、培養物をそのままの状態ですべて製品として利用できるように、培養廃棄物が発生することもない。

本章では、下水処理場より排出される汚泥脱水ケーキに各前処理を行ったものを基質として *Bacillus thuringiensis* の固体培養を行い、最大菌体孢子濃度に及ぼす前処理の効果を検討した。

## 5-2 実験方法

### (1) 菌株

菌株として、*Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui を用いた。本菌を NYS 寒天培地で培養 (30°C, 24 時間) した。その後、冷蔵庫内 (4°C) で保存した。継代培養を行う場合には、コロニー中の菌の形態を顕微鏡観察し、雑菌汚染のないことを確認した。

NYS 寒天培地上に増殖したコロニーから白金耳を用いて菌を採取し、生理食塩水に懸濁させて菌懸濁液を調製した。

### (2) 汚泥脱水ケーキ

新潟市中部下水処理場ならびに船見下水処理場より、排出される脱水ケーキを試料として用いた。中部下水処理場では、初沈汚泥と余剰汚泥を重力濃縮した後、一部を嫌気消化 (メタン発酵) する。重力濃縮した汚泥と消化汚泥を洗浄した後、無機凝集剤 (塩化第二鉄, 消石灰) を添加して、フィルタープレスで脱水する。この脱水ケーキを試料とした。船見処理場では、重力濃縮した汚泥と消化汚泥を洗浄した後、高分子凝集剤を添加してスクリュープレスで遠心脱水する。この脱水ケーキを試料とした。両脱水ケーキの代表的特性値は下記の通りである。

中部下水処理場のケーキ 含水率約 50%, MLVSS/MLSS = 約 0.3

船見下水処理場のケーキ 含水率約 75%, MLVSS/MLSS = 約 0.5

### (3) 前処理

ミキサーを用いて汚泥ケーキを粉砕し、ふるい分けして粒度を 600~710  $\mu\text{m}$  に調整した。可溶化前処理として、凍結融解、気泡析出、オゾン酸化、過酸化水素酸化、マイクロ波加熱を検討した。各処理を行った後、オートクレーブによる加熱殺菌操作を行った。

#### ・凍結融解処理

汚泥ケーキを 50 mL 容ビーカーに入れた。ビーカーを低温恒温槽内に浸漬して 24 時間保持しケーキを凍結させた。その後、常温で解凍した。凍結温度は -20°C とした。

#### ・気泡析出処理

加圧容器として限外濾過器を用いた。メンブランフィルターの代わりに OHP シートを設置した限外濾過器 (アドバンテック, UHP-25K) を圧力容器として用いた。濾過器内にケーキを入れ、気相を二酸化炭素ガスで置換するために 5 分間二酸化炭素を供給した。その後容器出口を閉じて容器内を加圧した。圧力はガス容器の圧力調整器を用いて

調節した。所定の時間後に容器内を大気圧に開放した。加圧圧力は 0.3 MPa, 保持時間は 3 h とした。なお, 船見処理場のケーキを用いた場合には, 耐圧工業製加圧容器も併用した。

#### ・過酸化水素処理

500 mL 容ビーカーにケーキを入れ, 過酸化水素水 (濃度 30 wt%) を加えた。過酸化水素の添加率は 0.5 g/g-MLVSS とした。

#### ・オゾン処理

実験装置は汚泥スラリーの場合と同様である。スラリーの代わりに脱水ケーキをビーカーに入れ, ビーカーをセパラブルフラスコに入れてオゾンを供給した。オゾン反応率は 0.005 g/g-MLVSS であった。

#### ・オートクレーブ処理

シャーレに汚泥ケーキを入れ, オートクレーブ処理を行った。温度は 121°C とし, 加熱時間は 20 分とした。

### (4) 培養方法

前処理したケーキならびにコントロールとして前処理していない脱水ケーキをオートクレーブで加熱殺菌 (121°C, 15 分) した。加熱殺菌した汚泥脱水ケーキを 5 g ずつ滅菌済シャーレに入れた。生理食塩水 10 mL に継代培養した Bt 菌を白金耳で掻き取り, Bt 菌懸を懸濁した。シャーレ中に接種菌体数が  $5.6 \times 10^4$  /mg-MLVSS となるように, Bt 菌懸濁液の濃度を調整し, 菌懸濁液を 1 mL 接種した。温度 30°C で静置培養した。

### (5) 分析方法

前処理前後の DOC 濃度を測定した。含水率は, 含水状態の試料の質量と乾燥後の質量の差を求めた。DOC 濃度の測定は次のようにして行った。汚泥サンプルをビーカーに入れ, 蒸留水を 100~300 mL 加え, スターラーバーを用いて 5 分間攪拌し, 汚泥を懸濁させた。その後, 懸濁液を遠心分離 (10,000 rpm, 15 min, 4°C) し, 上澄み液の TOC 濃度を測定した。加えた蒸留水の量と上澄み液の TOC 濃度より, 可溶化した有機物量を求めた。

サンプリングした処理ケーキを平板コロニー法により NYS 寒天培地に撒き, 30°C で培養した。生成したコロニーの数から菌体・孢子濃度を求めた。

### 5-3 実験結果と考察

#### (1) 中部下水処理場の脱水ケーキを用いた場合

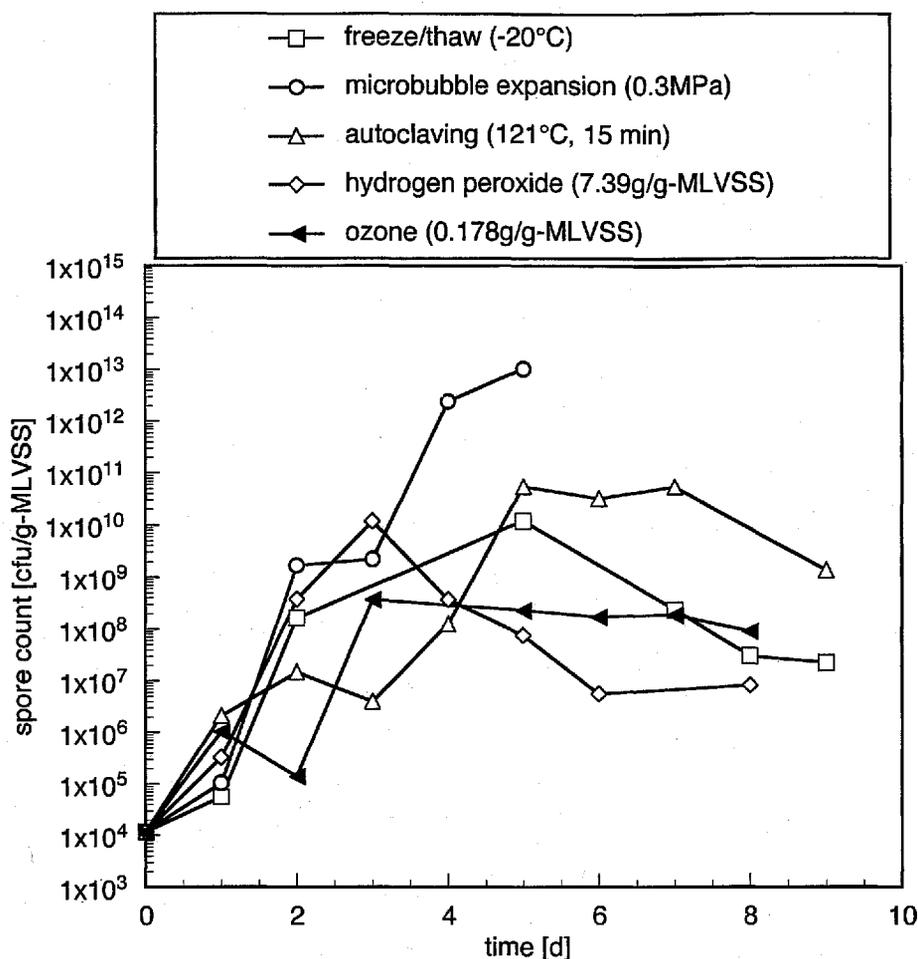


図 33 脱水ケーキを用いた固体培養における菌体・孢子濃度の変化

図 33 に脱水ケーキを基質とした Bt 菌の固体培養における菌体・孢子濃度の経時変化を示す。中部下水処理場の余剰汚泥スラリーを用いた場合と同様に、希釈倍率に伴う誤差のために菌体孢子濃度の値そのものを比較することはできないが、前処理の有効性を相対的に比較・検討することは可能であろう。図中、autoclaving は、脱水ケーキに前処理を行わず加熱殺菌のみを行った場合（対照実験）を示す。ケーキに前処理を行わない場合、菌体・孢子濃度は 5 日目に最大となった。凍結融解処理あるいは過酸化水素処理を行った場合、Bt 菌の増殖はやや速くなったが、最大濃度は未処理の場合と同程度であった。オゾン酸化処理を行った場合、最大菌体・孢子濃度は未処理の場合に比べて低く、菌体・孢子濃度は 3 日目以後は増加しなかった。これに対して、気泡析出処理を行った場合、菌体・孢子濃度の増加が速く、最大濃度も未処理の場合に比べて高かった。

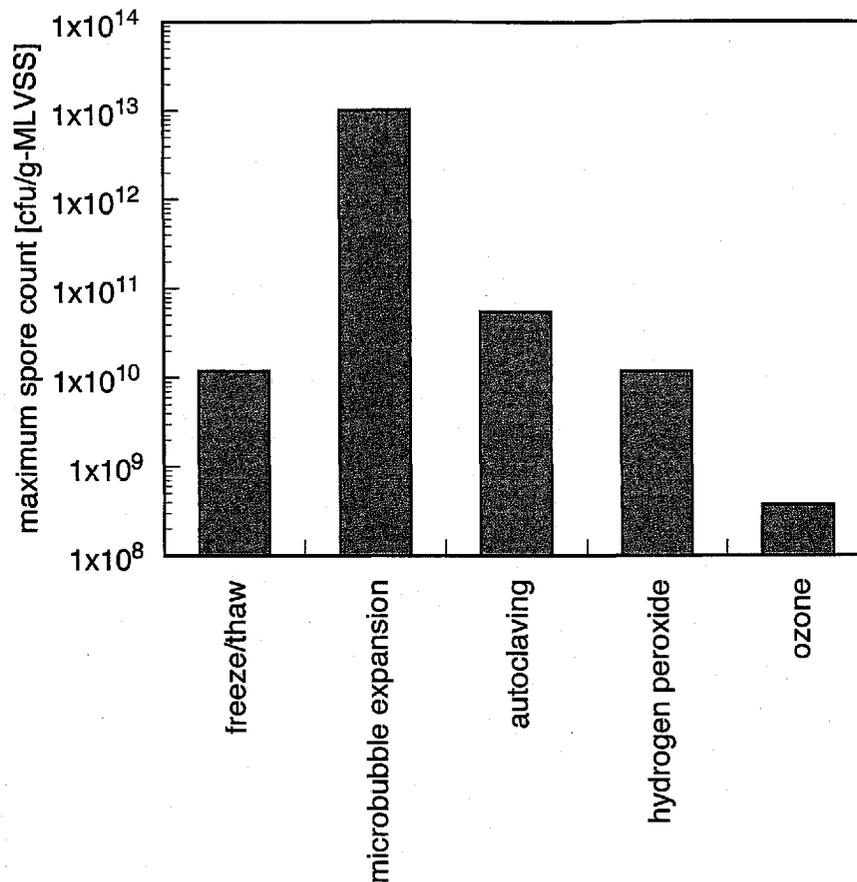


図 34 ケークを用いた固体培養における最大菌体・孢子濃度

図 34 に各前処理を行った場合の最大菌体・孢子濃度を示す。凍結融解処理あるいは過酸化水素処理を行った場合の最大菌体孢子濃度は、オートクレーブ単独の場合、つまり、脱水ケーキに前処理を行わずに加熱殺菌処理のみを行った場合と同程度であると判断される。気泡析出処理を行った場合の最大菌体孢子濃度の値そのものに信頼性は低いものの、対照実験(オートクレーブ処理)に比べて最大菌体孢子濃度は高いと判断される。気泡析出処理では、図 33 の結果からも培養初期から菌の増殖速度、孢子形成速度が対照実験よりも高いことが示されている。これらの結果より、汚泥脱水ケーキを基質として Bt 菌の固体培養において、気泡析出処理は前処理として効果的であると考えられる。一方、オゾン処理を行った場合の最大菌体孢子濃度は対照実験に比べて低いと判断される。この理由としては、余剰汚泥スラリーを用いた液体培養の場合と同様に、難分解性物質あるいは阻害作用を有する物質の副成が考えられる。

なお、中部下水処理場の汚泥脱水操作は、無機凝集剤とフィルタープレスの組み合わせにより行われている。無機凝集剤の添加量が多いため、汚泥の有機物含有量 (MLVSS/

MLSS) は約 30%と比較的低い。これは、脱水ケーキを有機質資源として評価する場合に不利となる要因である。さらに、図 33, 34 に示した結果を追試するために、別の日に採取した脱水ケーキを用いて Bt 菌の培養を行ったところ、Bt 菌の増殖を確認することができなかった。汚泥ケーキを蒸留水に懸濁して pH を測定した結果、約 11 とかなりアルカリ側に偏っていることが分かった。これは、無機凝集剤として塩化第二鉄塩と消石灰を添加しているためと考えられる。図 33, 34 の場合、脱水ケーキ懸濁液の pH を測定しなかったため、pH の影響を確認することはできないが、追試で Bt 菌が増殖しなかった理由として、無機凝集剤の添加により pH がアルカリ側に偏って Bt 菌の増殖に不適切であったことが考えられる。また、汚泥ケーキの pH がアルカリ側に偏っていた場合、気泡析出処理において二酸化炭素ガスで加圧することにより、pH が中和される効果と二酸化炭素の溶解量が増加する効果が考えられる。これらの点については、気泡析出の前処理効果を明らかにする上で、さらに検討が必要である。

## (2) 船見下水処理場の脱水ケーキを用いた場合

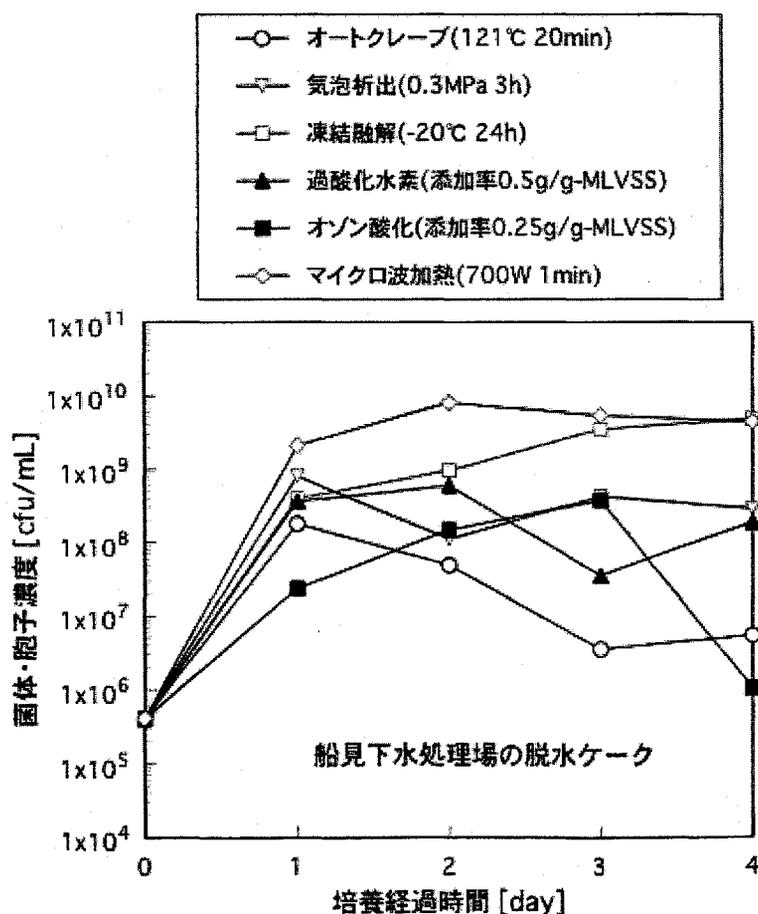


図 35 船見処理場の脱水ケーキを用いた場合の Bt 菌増殖経過

船見下水処理場では、高分子凝集剤を添加した後にスクリーンプレスによる遠心脱水を行っている。脱水ケーキの含水率は約75%、有機物の含有量（MLVSS/MLSS）は約50%である。船見処理場脱水ケーキを用いた場合、新たにマイクロ波による加熱処理を行った。図35にBt菌の増殖経過を示す。前処理を行わない対照実験の場合、菌体孢子濃度は培養1日目に最大となり、その値は $10^8$  cfu/g-MLVSSのオーダーであった。オゾン処理を行った場合、菌体孢子濃度は徐々に増加し、3日目で $10^8$  cfu/g-MLVSSのオーダーに達した。オゾン処理ではBt菌の増殖が他の場合に比べて遅かった。この原因として、これまで考察してきたように、オゾン酸化により何らかの阻害物質が副成した可能性が考えられる。一方、過酸化水素処理、気泡析出処理では、1日目に菌体孢子濃度が最大値に達し、その値は $10^8$  cfu/g-MLVSSのオーダーであった。また、未処理の場合には2日目以降菌体孢子濃度は減少したが、過酸化水素処理と気泡析出処理では菌体孢子濃度の低下はほとんど見られなかった。一方、凍結融解処理では、菌体孢子濃度が徐々に増加し、4日目にはほぼ $10^{10}$  cfu/g-MLVSSのオーダーに達した。また、マイクロ波加熱を行った場合、2日目にほぼ $10^{10}$  cfu/g-MLVSSのオーダーに達した。これらの処理では、Bt菌の増殖に及ぼす前処理の効果が明らかに認められた。

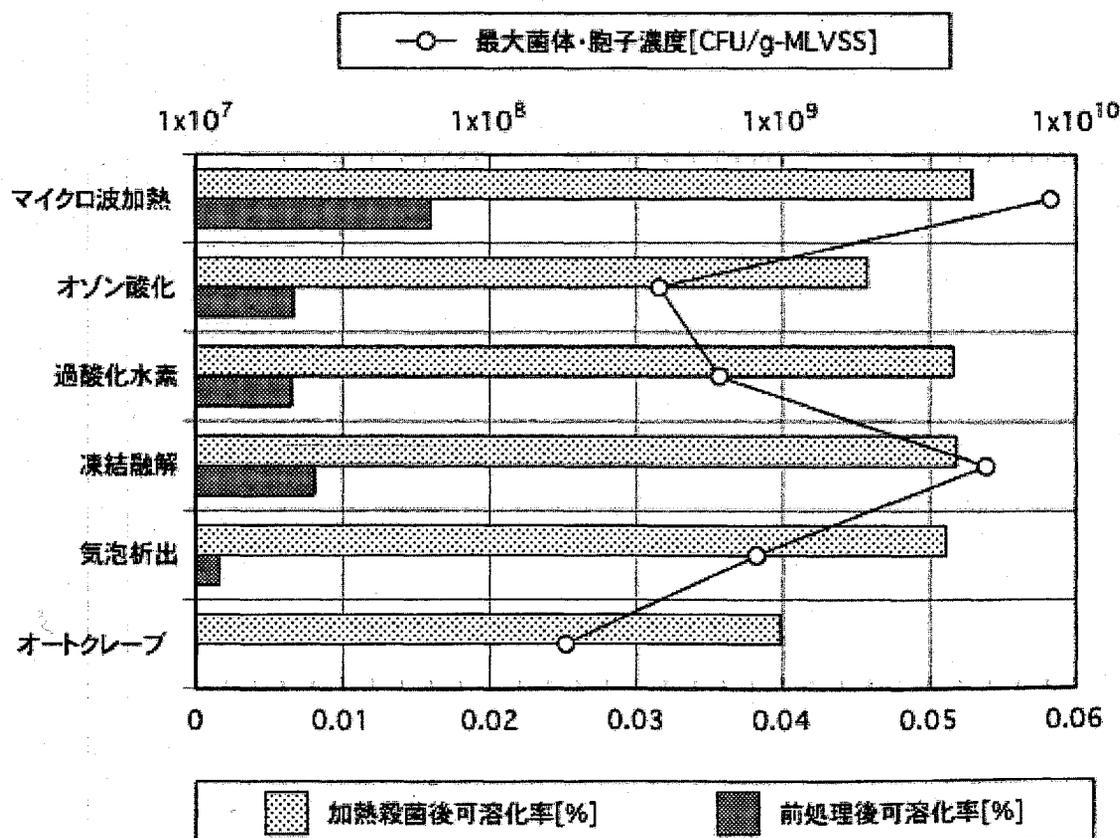


図36 最大菌体孢子濃度と可溶化率の関係

図 36 に、最大菌体胞子濃度と前処理後可溶化率、加熱殺菌後可溶化率の関係を示す。前処理単独の可溶化率はマイクロ波加熱が最も高く、約 1.6 %であった。凍結融解処理による可溶化率が約 0.8 %、オゾン処理あるいは過酸化水素処理による可溶化率がほぼ等しく、約 0.7 %、気泡析出処理の可溶化率が約 0.2 %で最も低かった。本研究で検討した前処理は、いずれの処理でも加熱殺菌後に可溶化率がオートクレーブ処理単独の場合に比べて増加した。マイクロ波加熱、過酸化水素、凍結融解、気泡析出処理はいずれも加熱殺菌後可溶化率は 5.2 %程度であった。これに対して、オゾン処理では加熱殺菌後の可溶化率が約 4.5 %であり、他の前処理に比べてやや低かった。前処理後可溶化率と最大菌体胞子濃度の関係、あるいは、加熱処理後可溶化率と最大菌体胞子濃度の関係を図 37 に示す。

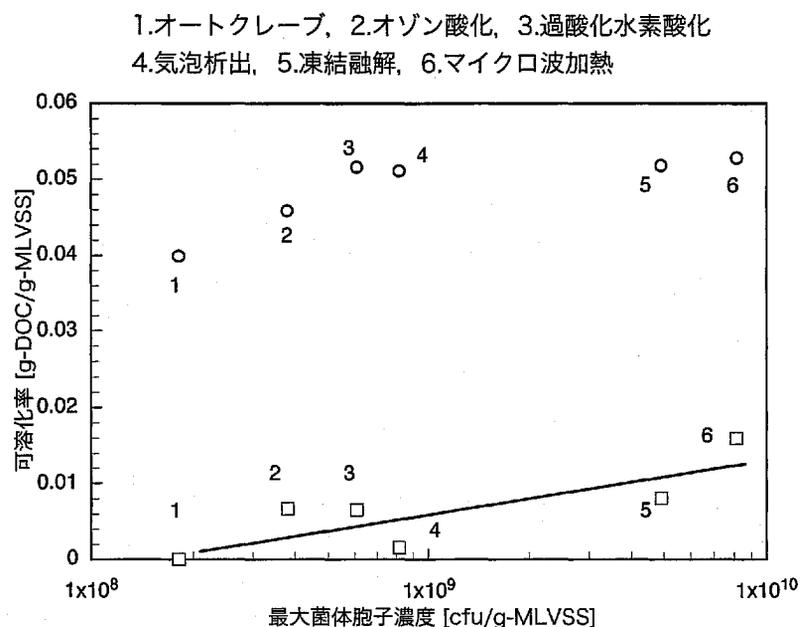


図 8 ケークを基質とした固体培養における前処理の効果

加熱殺菌処理後可溶化率は、オゾン処理を除いてほとんど同じ値であり、最大菌体胞子濃度との相関性は見られなかった。一方、前処理後可溶化率と最大菌体胞子濃度の関係では、正の相関性が認められる (全データの相関係数  $r^2 = 0.67$ )。しかし、これまで述べてきたように、オゾン酸化による可溶化率は高いものの、最大菌体胞子濃度は他の前処理方法に比べて低い。また、気泡析出処理では、前処理後の可溶化率はほとんどゼロであるのに対して、最大菌体胞子濃度は比較的高かった。これらの処理を除外すると、最大菌体胞子濃度は前処理可溶化率の間には比較的高い相関関係が認められる (相関係数  $r^2 = 0.82$ )。しかしながら、図中の直線で示した相関関係にのる前処理は、脱水ケーキの資化性の観点からは同等の処理法であるとみなすこともできる。つまり、前処理に

よって可溶化した有機物の量に比例して最大菌体孢子濃度も増加すると解釈できる。一方、オゾン酸化は可溶化率は高いものの最大菌体孢子濃度が低いことから、前処理によって汚泥ケーキの資化性が低下した可能性がある。また、気泡析出処理では、可溶化が直接 Bt 菌の増殖に関与したわけではなく、気泡析出処理によって溶存態有機物の増加以外に Bt 菌の増殖を促進する条件が整った可能性がある。各前処理の最適化を図るためにもさらに前処理条件や投入エネルギーと最大菌体孢子濃度との関係について検討を行う必要がある。

#### 5-4 まとめ

下水処理場より排出される汚泥脱水ケーキをバイオ殺虫剤生産用固体培地として利用することを目的として、脱水ケーキに前処理を行い、*Bacillus thuringiensis* の培養ならびに孢子形成に及ぼす効果を検討した。汚泥脱水ケーキとして、無機凝集剤+フィルタープレスによる脱水ケーキ、高分子凝集剤+スクリーンプレスによる脱水ケーキを用いた。また、前処理方法として、気泡析出、凍結融解、超音波、マイクロ波加熱、オゾン酸化、過酸化水素酸化などを取り上げた。

脱水ケーキを用いた Bt 菌の固体培養においても、Bt 菌の増殖・孢子形成に前処理が効果的であることを確認した。凍結融解、超音波、過酸化水素、マイクロ波加熱処理では、前処理後可溶化率あたりの最大菌体孢子濃度がほぼ等しいことが分かった。これは、これらの前処理では可溶化率あたりの汚泥脱水ケーキの資化性に大きな違いがないことを示唆している。一方、オゾン処理を行った脱水ケーキでは、可溶化率が大きいものの最大菌体孢子濃度が他の前処理を行った脱水ケーキの場合と比べて低い傾向にあった。これは、オゾン処理では可溶化率あたりの汚泥脱水ケーキの資化性が低くなっていたことを示している。また、気泡析出処理では、逆に、可溶化率あたりの脱水ケーキの資化性が高いことが分かった。この理由としては、溶存態有機物の他に pH 等の環境因子が関係している可能性が示唆された。

下水処理場から排出される汚泥脱水ケーキを基質とした *Bacillus thuringiensis* の固体培養によりバイオ殺虫剤の生産が可能であることを確認した。また、脱水ケーキに前処理を行うことにより、バイオ殺虫剤の生産に結びつく菌体増殖、孢子形成を促進できることが分かった。今後は、環境条件の影響を含めて、前処理最適条件の探索が必要である。

## 第6章 総括

本研究では、下水処理場に代表される生物学的廃水処理施設から排出される汚泥を原料としてバイオ殺虫剤生産の可能性、ならびに、各種前処理による資化性の向上、バイオ殺虫剤生産促進の可能性について検討した。

第2章では余剰汚泥スラリーを対象とした細胞壁破碎処理の効果について検討した。余剰汚泥返送スラリーを対象として、凍結融解、気泡析出、超音波照射、オートクレーブ、過酸化水素酸化、オゾン酸化といった前処理方法を取りあげ、細胞壁破碎処理の効果調べた。また、それぞれの前処理方法について代表的な操作パラメーターの影響を明らかにした。

凍結融解、気泡析出、超音波照射、オートクレーブ処理について、所要エネルギーを概算し、可溶化処理のエネルギー効率を評価した。気泡析出処理は、可溶化率は低いものの可溶化エネルギー効率が高い処理方法であることを明らかにした。超音波処理、オートクレーブ処理は、可溶化エネルギー効率は低いものの可溶化率が比較的高い処理方法であることを明らかにした。凍結融解処理は可溶化エネルギー効率、可溶化率ともに、超音波処理やオートクレーブ処理に比べて、やや低いことを明らかにした。

第3章では汚泥脱水ケーキを対象とした細胞壁破碎処理の効果について検討した。汚泥脱水ケーキを対象として、資化性を向上させるための前処理の効果を可溶化率を指標として検討した。

凍結融解処理では、汚泥ケーキ含水率の低下とともに可溶化率が大きく低下した。また、気泡析出処理も可溶化率がケーキ含水率とともに低下した。この理由として、汚泥ケーキの含水率が減少するとともに、細胞内の自由水量が減少し、凍結や気泡析出の効果が現れにくくなったことが考えられる。

過酸化水素処理では、可溶化率は汚泥ケーキ含水率にほとんど依存しなかった。この理由として、過酸化水素処理では、濃度 30 wt% の水溶液の形で過酸化水素を汚泥ケーキに加えるため、汚泥ケーキに含まれる水量よりも過酸化水素水によって供給される水量が多い。このため見かけ上汚泥ケーキの含水率が可溶化率にほとんど影響しなかったと考えられる。一方、オゾン処理における可溶化率のケーキ含水率依存性は、気泡析出処理の場合に比べてやや低かった。オゾン処理では、溶存オゾンが菌体細胞壁を外側から酸化することで細胞壁に損傷を与え、可溶化が行われると考えられる。オゾン処理の場合には、気泡析出の場合と異なり、オゾンが細胞内部に拡散する必要はない。また、

溶存オゾン以外にも気相から直接オゾンが反応する可能性がある。これらの理由により、オゾン処理における可溶化率は、ケーキの含水率が低下するに伴って減少するが、気泡析出よりは含水率の影響を受けにくいと推察される。

オートクレーブ処理では、可溶率のケーキ含水率に対する依存性は気泡析出処理の場合とほぼ同じであった。オートクレーブ処理では水蒸気により加熱が行われる。汚泥は水蒸気に接しているために、汚泥ケーキが乾燥していたとしても、スチームから水分が補給される。このために、可溶化率の含水率依存性は弱いと予想された。しかし、可溶化率の含水率依存性は比較的強いことがわかった。

一方、可溶化率の大きさとしては、加熱処理（オートクレーブ処理）が最も高く、次に化学的酸化処理（過酸化水素処理、オゾン酸化処理）が続いた。機械的処理（気泡析出、凍結融解）の可溶化率が最も低かった。

可溶化率の結果は、溶存態となった有機物の割合である。菌体を構成する有機物質が完全に溶出しなくても、前処理した菌体の有機物質を *Bacillus thuringiensis* が資化しやすくなれば目的は達成される。従って、可溶化率に加えて、対象とする微生物の増殖や目的生産物の生産性を検討する必要がある。

第4章では余剰汚泥スラリーを基質としたバイオ殺虫剤の生産について検討した。下水処理場における標準活性汚泥法の余剰汚泥に各種の前処理を行い、Bt 菌の培養を行った。前処理方法としては、気泡析出、凍結融解、超音波、マイクロ波加熱、オゾン酸化、過酸化水素酸化などを取り上げた。前処理した汚泥スラリーをオートクレーブにより加熱殺菌し、Bt 菌の基質として用いた。

気泡析出、凍結融解処理では汚泥の可溶化率はわずかであったが、未処理の余剰汚泥スラリーに比べて最大菌体孢子濃度が増加した。また、マイクロ波加熱処理では、可溶化率、最大菌体孢子濃度ともに高かった。すなわち、余剰汚泥スラリーを基質としてBt 菌の培養が可能であり、前処理によって最大菌体孢子濃度を高めることが可能であることを確認した。

なお、前処理方法としてオゾン酸化あるいは過酸化水素処理を行った場合には、最大菌体孢子濃度が未処理の場合よりも低下する傾向にあった。この理由として強力な酸化剤によりBt 菌の増殖に阻害作用のある物質が副成した可能性があげられる。

第5章では汚泥脱水ケーキをを基質としたバイオ殺虫剤の生産について検討した。下水処理場より排出される汚泥脱水ケーキをバイオ殺虫剤生産用固体培地として利用することを目的として、脱水ケーキに前処理を行い、*Bacillus thuringiensis* の培養ならびに

胞子形成に及ぼす効果を検討した。汚泥脱水ケーキとして、無機凝集剤＋フィルタープレスによる脱水ケーキ、高分子凝集剤＋スクリュープレスによる脱水ケーキを用いた。また、前処理方法として、気泡析出、凍結融解、超音波、マイクロ波加熱、オゾン酸化、過酸化水素酸化などを取り上げた。

脱水ケーキを用いた Bt 菌の固体培養においても、Bt 菌の増殖・胞子形成に前処理が効果的であることを確認した。凍結融解、超音波、過酸化水素、マイクロ波加熱処理では、前処理後可溶化率あたりの最大菌体胞子濃度がほぼ等しいことが分かった。これは、これらの前処理では可溶化率あたりの汚泥脱水ケーキの資化性に大きな違いがないことを示唆している。一方、オゾン処理を行った脱水ケーキでは、可溶化率が大きいものの最大菌体胞子濃度が他の前処理を行った脱水ケーキの場合と比べて低い傾向にあった。これは、オゾン処理では可溶化率あたりの汚泥脱水ケーキの資化性が低くなっていたことを示している。また、気泡析出処理では、逆に、可溶化率あたりの脱水ケーキの資化性が高いことが分かった。この理由としては、溶存態有機物の他に pH 等の環境因子が関係している可能性が示唆された。

下水処理場から排出される汚泥脱水ケーキを基質とした *Bacillus thuringiensis* の固体培養によりバイオ殺虫剤の生産が可能であることを確認した。また、脱水ケーキに前処理を行うことにより、バイオ殺虫剤の生産に結びつく菌体増殖、胞子形成を促進できることが分かった。今後は、環境条件の影響を含めて、前処理最適条件の探索が必要である。

以上をまとめると、返送汚泥スラリーならびに下水処理場から排出される汚泥脱水ケーキを用いて、バイオ殺虫剤の生産が可能であることを確認した。また、可溶化を目的とした前処理を行うことによって生産性を向上できることを明らかにした。さらに、前処理方法として、気泡析出、凍結融解、超音波、マイクロ波加熱、オゾン酸化、過酸化水素酸化の概略を明らかにするとともに、それらの問題点もあわせて指摘した。本研究の成果は、汚泥を微生物培養用基質として利用することにより、汚泥発生量を削減する上で、新しい選択肢を生成するとともに基礎的な知見を与えるものである。

## 参考文献

- Ahn, K.-H., Yeom, I.-T., Park, K. Y., Maeng, S. K., Lee, Y., Song, K.-G. and Hwang, J.-H.; "Reduction of sludge by ozone treatment and production of carbon source for denitrification," ASIAN WATERQUAL 2001, pp. 605-610 (2001).
- Camacho, P., Deleris, S., Geaugey, V., Ginestet, Ap. and Paul. E. (2002). A comparative study between mechanical, thermal and oxidative disintegration techniques of waste activated sludge. *Wat. Sci. Technol.*, **46** (10), 79-87.
- Liu, Y. and Tay, J.-H.; "Strategy for minimization of excess sludge production from the activated sludge process," *Biotechnol. Adv.*, **19**, 97-10 (2001).
- Low, E. W. and Chase, H. A.; "Reducing production of excess biomass during wastewater treatment," *Wat. Res.*, **33**, 1119-1132 (1999).
- Müller, J. A.; "Prospects and problems of sludge pre-treatment processes," *Wat. Sci. Technol.*, **44**, 121-128 (2001).
- Tiehm, A., Nickel, K., Zellhorn, M. and Neis, U.; "Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization," *Wat. Res.*, **35**, 2003-2009 (2001).
- Vidyarathi, A. S., Tyagi, R. D. and Valéro, J. R.; "Effect of surface active agents on the production of biopesticide using wastewater sludge as a raw material," *Wat. Sci. Technol.*, **44**, 253-259 (2001).