


論文目録

氏名 Lee Boon Sing 

学位論文

題目 し尿処理における処理機能と優占細菌相の生化学的性質との関連性に関する研究

学位論文の基礎となる学術論文

題目 好気性無臭し尿処理に優占する細菌相の変化

著者名 李文生・青木満・入江鏡三・村上弘毅・建臣耕一

学術雑誌名 日本水処理生物学会 に発表・発表予定

(巻・号・頁) (32. 2. 93 ~ 104)

発行年月 1996 年 4 月

題目 好気性無臭し尿処理における優占化を維持する *Bacillus* sp. と *Oerskovia* sp. の種の同定

著者名 李文生・青木満・入江鏡三・田端信一郎・村上弘毅・建臣耕一

学術雑誌名 防菌防衛 に発表・発表予定

(巻・号・頁) (24. 11. 709 ~ 717)

発行年月 1996 年 11 月

題目 し尿処理施設における優占細菌相と処理状況の解析に関する研究

著者名 李文生・入江鏡三・青木満

学術雑誌名 防菌防衛 に発表・発表予定

(巻・号・頁) (. . ~)

発行年月 年 月

既発表学術論文

題目 好気性無臭し尿処理において優占する
Bacillus sp. の種の同定

著者名 村上弘毅、李文生、工井幸夫、青木満、入江金三、建石耕一

学術雑誌名 日本水処理生物学会誌 に発表・発表予定

(巻・号・頁) (32 . 2 . 105~110)

発行年月 1996 年 月

題目 Interspecific Pollen-Pistil Interaction and
Hybridization in Genus Fagopyrum

著者名 Hirose, T., Lee, B.S., Okuno, I., Konishi, A.A., Mīmani, M
and Ujihara, A.

学術雑誌名 Current Advances in Buckwheat Research に発表・発表予定

(巻・号・頁) (. . 239~245)

発行年月 1995 年 8 月

題目 _____

著者名 _____

学術雑誌名 _____ に発表・発表予定

(巻・号・頁) (. . ~)

発行年月 _____ 年 月

題目 _____

著者名 _____

学術雑誌名 _____ に発表・発表予定

(巻・号・頁) (. . ~)

発行年月 _____ 年 月

し尿処理における処理機能と優占細菌相
の生化学的性質との関連性に関する研究

1996年

院 科 学
学 究 科
大 学 大 学
大 学 大 学
大 学 大 学
院 科 学
院 科 学
(信州大学)

Lee Eon Sing

②

し尿処理における処理機能と優占細菌相の生化学的性質との関連性に関する研究

Lee Boon Sing

Studies on the relationships between the treatment ability of night soil and the biochemical characteristics of the dominantly growing bacteria

Summary

In 1991, the dominantly growing bacteria were isolated from the aerobic night soil digestion tanks at Inachuo Sanitation Center. 98% of them were found to be *Bacillus* sp.. The isolated *Bacillus* sp. were identified as *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* and *B. subtilis*.

In 1993, the treatment procedure of this facility was improved. We conjectured that the treatment ability of activated sludge conditions were favorably changed on the basis of dominantly growing bacteria. The analysis of dominantly growing bacteria was an indispensable study for solving the malodorless waste treatment. However till now there were no report about the analysis and comparison of the dominantly growing bacteria except Inacuo sanitation.

The purpose of this study is to solve a correlation between the biochemical characteristics of dominantly growing bacteria and the treated conditions on biological treatment process. We reinvestigated dominantly growing bacteria of the night soil at treatment tanks of Inachuo Sanitation Center in 1994, and tried to solve the primary factors. We also isolated the dominantly growing bacteria from the night soil of the several facilities which were graded on the basis of the ratio of excess sludge volume to the changed volume. The result is described as follows.

1. About the transition of the dominantly growing bacteria and the explanation of the improvement of treatment.

The number of bacteria was about $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml, and 43~77% of them were counted for *Bacillus* sp., 5~18% for Nocardioform bacteria, 12~27% for gram-positive bacteria, 2~16% for gram negative bacteria, 2% for cocci and 3% for *Clostridium* sp.. *Bacillus* sp. and *Oerskovia* sp. occupied a maximum of 95%. *Bacillus* sp. were identified as *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* and *B. schlegelii*. *Oerskovia* sp. were identified as a *O. turbata*.

B. thuringiensis were occupied 46% in 1991. In 1994 *B. thuringiensis* were decreased to below 1.4%. *B. schlegelii*, gram-positive bacteria and *Clostridium* sp. were newly isolated, and the number of Nocardioform bacteria were increased. It was observed obviously that dominantly growing bacteria had a high diversity.

In 1991 *B. thuringiensis* were served for the assimilation of starch and soybean oil, hydrogen sulfide and ammonia. In 1994 *O. turbata* participated in the hydrolysis of starch. In the assimilation of soybean oil and starch respectively the participants were *B. schlegelii*, *O. turbata*, cocci and *O. turbata*, *B. subtilis*, while *B. pumilus* and *B. subtilis* hydrolyzed cooked meat, and solubilizing ability was increased. These transition were an important

primary factor for the improvement of waste treatment .

2. Comparison of the dominantly growing bacteria from the several facilities

The treatment conditions were graded on the basis of the ratio of the volume of the dehydrated excess sludge to that of charge as follows; Inachuo (3.3%), D (5.7%), C (7.4%), B (39%) and A (90%).

The number of bacterium in the different facilities A ,B and C were $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml, this value was near than Inachuo Sanitation. The number of bacteria in D facility was $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/ml. The isolated bacterium were classified as *Bacillus* sp., gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, cocci, and *Clostridium* sp.. The ratio of the number of *Bacillus* sp. from the each facilities were high, Nocardioform bacteria was isolated only from the D facility.

The bacteria isolated from A and B facility lacked the solubilizing ability ward oil below 13% of total bacteria detected. The solubilizing ability toward fat was found to be important because it decreased the volume of the excess sludge. The solubalizable ability of starch was correlated with the malorless waste treatment.

The isolated bacteria were vigorously grew on the night soil agar, this result showed that the isolated bacteria were related to waste treatment. The isolated *Bacillus* sp. from A-D facilities which solubilized cooked meat were identified as *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. subtilis*.. Nocardioform bacteria which was only isolated from D facility was *O.turbata*.

目次

序章	1
第1章 好気性無臭し尿処理の効率化と優占細菌相の変化	5
1.1 緒言	5
1.2 運転状況	5
1.2.1 受入貯留工程	6
1.2.2 生物処理工程	6
1.2.3 脱臭工程	7
1.2.4 高度処理および汚泥処理工程	7
1.3 実験材料および方法	8
1.3.1 細菌類・酵母の分離および単離	8
1.3.1.1 活性汚泥の採取	8
1.3.1.2 細菌類・酵母の分離	8
1.3.1.3 細菌類・酵母の単離	8
1.3.2 単離細菌類・酵母の分類	9
1.3.2.1 形態学的性質	9
1.3.2.2 生化学的性質	10
1.3.3 <i>Bacillus</i> sp. およびカルシウム型細菌の種の同定	11
1.3.3.1 GC含量の測定	11
1.3.3.2 MicroLog™ System による同定	12
1.3.4 単離した細菌類・酵母の分解・資化性試験	13
1.3.4.1 澱粉分解試験	13
1.3.4.2 油脂分解試験	14
1.3.4.3 蛋白質分解試験	14

1. 3. 4. 4	悪臭成分分解・利用性試験	14
1. 3. 4. 5	脱窒性実験	15
1. 3. 5	単離細菌類・酵母の生育試験	15
1. 3. 5. 1	世代時間の測定	15
1. 3. 5. 2	金属イオンの添加による生育試験	15
1. 3. 5. 3	し尿寒天培地での生育試験	16
1. 4	結果	16
1. 4. 1	総細菌数	16
1. 4. 2	細菌類・酵母の単離	17
1. 4. 3	桿状細菌の分類	17
1. 4. 3. 1	内生孢子形成性桿菌の分類	17
1. 4. 3. 2	内生孢子非形成性桿菌および嫌気性桿菌の分類	18
1. 4. 4	優占細菌の割合	18
1. 4. 5	<i>Bacillus</i> sp. およびカスピア型細菌の種の同定	19
1. 4. 5. 1	<i>Bacillus</i> I の種の同定	19
1. 4. 5. 2	<i>Bacillus</i> II の種の同定	21
1. 4. 5. 3	<i>Bacillus</i> III の種の同定	23
1. 4. 5. 4	カスピア型細菌の種の同定	24
1. 4. 5. 5	球菌類の同定	25
1. 4. 6	単離細菌類の分解・資化性	25
1. 4. 6. 1	澱粉、ククトミド、大豆油の分解資化性に関与する細菌	25
1. 4. 6. 2	悪臭成分の分解・利用性に関与する細菌	26
1. 4. 6. 3	脱窒性に関する細菌	27
1. 4. 7	単離細菌の生育性	27
1. 4. 7. 1	世代時間	27

1. 4. 7. 2	金属イオンの添加に及ぼす影響	27
1. 4. 7. 3	し尿寒天培地による生育	29
1. 5	考察	29
1. 5. 1	細菌相の変化	29
1. 5. 2	<i>Bacillus</i> sp. と <i>O. turbata</i> の高濃度維持について	30
1. 5. 3	し尿処理がより効率化になった要因について	30
1. 6	要約	33
第2章	各種し尿施設における細菌相と処理状況との関連性	62
2. 1	緒言	62
2. 2	処理方式と処理状況	63
2. 2. 1	A施設	63
2. 2. 2	B施設	63
2. 2. 3	C施設	64
2. 2. 4	D施設	64
2. 2. 5	各施設の処理状況	64
2. 3	実験材料および方法	66
2. 3. 1	活性汚泥の採取	66
2. 3. 2	細菌類・酵母の分離	66
2. 3. 3	細菌類・酵母の単離	66
2. 3. 4	単離細菌類・酵母の分解・資化性試験	67
2. 3. 4. 1	澱粉分解試験	67
2. 3. 4. 2	油脂分解試験	67
2. 3. 4. 3	蛋白質分解試験	68
2. 3. 4. 4	悪臭成分分解・利用性試験	68

2. 3. 5	単離細菌類・酵母の生育性	68
2. 3. 6	<i>Bacillus</i> sp. および <i>カルシ</i> 型細菌の種の同定	68
2. 4	結果	69
2. 4. 1	総細菌数	69
2. 4. 2	優占細菌の割合	70
2. 4. 2. 1	A施設	70
2. 4. 2. 2	B施設	70
2. 4. 2. 3	C施設	71
2. 4. 2. 4	D施設	71
2. 4. 3	単離細菌類の分解・資化性	71
2. 4. 3. 1	A施設	72
2. 4. 3. 2	B施設	73
2. 4. 3. 3	C施設	74
2. 4. 3. 4	D施設	74
2. 4. 4	単離細菌類の生育	75
2. 4. 4. 1	し尿寒天培地による生育	75
2. 4. 4. 2	金属イオンの添加に及ぼす生育の影響	75
2. 4. 5	<i>Bacillus</i> sp. および <i>カルシ</i> 型細菌の種の同定	76
2. 5. 1. 1	A施設	76
2. 5. 1. 2	B施設	78
2. 5. 1. 3	C施設	78
2. 5. 1. 4	D施設	78
2. 5	考察	80
2. 5. 1	汚泥の生成率と細菌相の生化学的性質との関連性	80
2. 5. 2	脱窒機構について	82

2. 5. 3 無臭処理機構について	83
2. 5. 4 クット [®] ミート分解性 <i>Bacillus sp.</i> の種の特徴	84
2. 6 要約	85
第3章 総考察と今後の展望	109
謝辞	114
引用文献	115

序章

活性汚泥法は 1914 年に Aerdern と Lockett によって開発された。この 80 年余りの間、活性汚泥法を中心とした排水処理プロセスが生活系および産業排水の処理に広く適用されている。ところが、活性汚泥細菌に関する研究はかなり遅れている。当初、活性汚泥法の浄化作用は生物学的作用か、物理学的作用かについて激しい論争が広げられた。1939 年に生物学説が定着した。現在まで、生物処理に関与する細菌として報告されているのは、フロック形成に関係するとされる *Zoogloea* sp.¹⁾、ハルキングに関係するとされる *Sphaerotilus* sp.²⁾、硝化に関係するとされる *Nitrosomonas* sp.³⁾ 等および脱窒に関係するとされる細菌類⁴⁾である。また、下水処理における活性汚泥細菌では上記の細菌類に加えて *Bacillus* sp. を含む多種の細菌が出現すると報告されている⁵⁾⁶⁾³⁹⁾⁴⁰⁾。その内、グラム陰性細菌が処理の主役であり、可溶性 BOD 成分を分解資化し、不可溶性成分は生物処理工程では分解資化できないと考えられている。このように活性汚泥細菌の性質が詳細に解明されていないため、生物処理工程の維持管理が難しく、経験的に行われており、処理が悪化した時に対応できないのが現状である。

し尿処理施設は日本の独特な施設である。1953 年からし尿処理施設が誕生した。当時、処理方式は大半が嫌気性消化後、処理水を水で希釈後、高速散水ろ床法による処理を行っていた。その後、化学的処理、湿式酸化処理などの施設が設置されたが、1959 年から嫌気消化を行った後、脱離希釈水の好気性 2 次処理

として活性汚泥法を採用した。1965年頃から嫌気性処理が生成するガスの悪臭問題を解消するために好気性処理のみによるし尿施設が出現し主流を占めるようになった。1985年に窒素、磷の排水規制が強化され、高度処理プロセスが適用された。その後、窒素の除去技術として低希釈二段活性汚泥法が主流となり、高負荷無希釈処理法も登場した。さらに、生物脱窒方式が取り入れられ、生物工程に続く高度処理によって処理水が規制値に達成するが、生物処理の過程に悪臭の発生、処理水質の変動、汚泥発生量が多いことなど数多くの基本的な問題が依然として存在している。近年、限外濾過膜などの高度処理技術が一部の施設に導入されている。限外濾過膜を高度処理に適用すると懸濁物質の固液分離が比較的容易であるが、目詰まりを起これやすいため、それに先立つ生物処理の良否が高度処理および設備の延命化を左右する場合が多い。し尿処理の改善あるいは高度な処理プロセスを安定的、十分に発揮するためには、処理に関与する細菌相と処理機構は解明が必要となっている。

伊那中央衛生センターでは好気性消化処理方式(200K/day)で、1979年から運転を開始した。1980~1985年には悪臭の発生、処理水質の変動、汚泥の脱水が困難な状態であった。1987年から原生動物を指標として適正な曝気量を維持すること、水処理剤の添加および返送量の監視を種々試みた結果、1989年頃から季節変動が解消され、処理に伴う悪臭問題の解決、余剰汚泥から悪臭が発生しなくなった。処理水BOD値も大幅に低下し、他の施設に見られない効率的で良好な処理が可能となった。村上

ら⁷⁾は 1991 年に良好な処理状態を保つ伊那中央衛生センター処理場の優占細菌類を単離し、優占する細菌類の 98%が *Bacillus* sp. で占められ、これらが処理の主役であることを報告した。同時に Mg^{2+} と Si が *Bacillus* sp. の濃度の増加およびフィラメントの切断に効果があることを明らかにした⁷⁾⁸⁾。1992 年春から当施設は $MgSO_4$ と黒曜石を水処理剤の代わりに消化槽第 1 槽に添加した。その後、この施設は急速に処理が悪化するショック状態の解消、処理水 BOD 成分の低減や短期的な投入量の増加が可能となり、処理状態はさらに改善されてきた。このような運転条件の変更によって処理槽内で細菌相の性質も何らかの変化をしていると推測した。この消化槽に優占する細菌相の長期間にわたる解析は効率的且つ無臭し尿処理の処理機構解明のために不可欠な課題である。一方、非効率的なし尿処理施設では消化槽の優占細菌を定量的に解析した研究報告はなく、生物処理工程における優占細菌の比較も知られていない。伊那中央衛生センター消化槽以外の優占細菌相の解析によって処理機能と優占細菌相の生化学的性質との関係について新しい知見が得られると考えられる。

このような視点から本研究ではより効率化した伊那中央衛生センターを含めてし尿処理施設 4ヶ所の活性汚泥優占細菌を解析し、伊那中央衛生センターのし尿処理の効率化の要因並びに処理機能と優占細菌相の生化学的性質との関連性について検討した。

第 1 章では、伊那中央衛生センターし尿消化槽の優占細菌相を再度解析し、1991 年時点の優占細菌相と比較した。し尿処理状態がより改善された優占細菌相とその生化学的性質を検討した。

第2章では、し尿処理施設4ヶ所の活性汚泥優占細菌を解析し、伊那中央衛生センターの活性汚泥優占細菌と比較した。各施設の優占細菌相の割合および資化性と汚泥生成率との関係について考察し、し尿処理機能と優占細菌相の生化学的性質との関係の解明を試みた。

第3章では、得られた結論を総括し、今後の研究課題をまとめた。

第1章 好気性無臭し尿処理の効率化と優占細菌相の変化

1.1 緒言

これまでに生活排水処理に関係した活性汚泥細菌類や処理機構の解析に関する研究報告は極めて少なく、生物処理工程はフラックボックスと考えられている。村上ら⁷⁾⁹⁾は長時間消化方式で好気性無臭し尿処理を実現した伊那中央衛生センターのし尿消化槽の細菌を1991年に解析し、*Bacillus* sp.が処理の役割であることを明らかにした。これらの大部分が *B.thuringiensis* と *B.pumilus* から成り、これらに *B.megaterium* と *B.subtilis* が含まれていることを明らかにした。

本研究では1993年12月から1994年4月にかけてこの処理槽の優占細菌相とそれらの生化学的性質を再度解析し、*Bacillus* sp. とノカルシア型細菌が処理に最も重要であることを確認した。これらの優占細菌の種について検討し、1991年時点の優占細菌相と比較した。この結果の基により効率的し尿処理を実現した優占細菌相とその生化学的性質の解明を試みた。

1.2 運転状況

伊那中央衛生センターは設計処理量 200K//day の好気性消化処理施設であり、その概要は Fig.1-1 に示した。1987年から原生動物を指標として曝気量、返送量の制御を行った。1989年から無臭処理が実現し、処理が大幅に改善された。1991年終わりに、処理に関わる細菌相が判明したので、消化槽の優占細菌の生化学的性質を効果的に生かすため、1992年から汚泥返送量および水

処理促進剤の投与などを変更し、運転を大幅に見直した。高度処理、汚泥処理および脱臭などの処理工程は変更していない。

1. 2. 1 受入貯留工程

し尿を除渣後、貯留槽で防臭のため、少量の浄化槽汚泥と混合し、消化槽へ定量的に投入している。Table1-1に示したように1993年11月時点最大446K/day、設計値の223%を投入しても支障なく効率的に処理を行っている。1993年12月頃から消化槽第4槽から受槽へ4m³/dayの汚泥を返送することによって悪臭・スカムの発生を防止している。

1. 2. 2 生物処理工程

1991年11月～1992年12月では消化槽のMLSSは7000～9000mg/l、BOD容積負荷は0.15Kg/m³・day、BODMLSS負荷は0.075Kg/KgMLSS・dayに維持していた。1992年の春から水処理促進剤を市販品から硫酸マグネシウムと黒曜石の粉末（珪酸源）に変更した。MgSO₄・7H₂Oを3Kg/day、黒曜石粉末2.5Kg/dayを第1槽に投入している。これらの添加によって槽内水のMg²⁺およびSiの含量が増加していた⁸⁾。曝気量は、第1槽に消化槽全体の70%の曝気量を使用し、細菌の発芽、増殖によってし尿の分解資化を促進している。消化槽内の細菌濃度を保つため、第1消化槽への汚泥返送量を3Qから6Q～10Qに増加している。第4槽の上澄水は第2曝気槽で曝気後、第2沈殿槽で固液分離し、浮上分離（1996年現在は凝集沈殿）を行っている。1993年～1994年

では消化槽の BOD 容積負荷は $0.725\text{Kg}/\text{m}^3 \cdot \text{day}$ 、BODMLSS 負荷は $0.106\text{Kg}/\text{KgMLSS} \cdot \text{day}$ に維持していた。なお、生物処理工程の維持管理として、毎日一回好気性消化槽第 1 槽、第 4 槽および曝気槽の原生動物を指標として消化槽の曝気状態と栄養状態を管理し、最近ではフロック外の細菌の有無を指標に加えている。フロック外に細菌が観察される時はし尿成分がフロックに充分吸着されていない状態、即ち過負荷の状態であると推定し返送量と曝気量を増加している。

1. 2. 3 脱臭工程

受槽および貯留槽の高濃度臭気は第 1 消化槽に吹込み、脱臭を行っている。硫化水素、最高 2000ppm の時、脱臭後約 5ppm 以下である。脱臭装置入り口でアンモニア 0 、硫化水素 $0 \sim 5\text{ppm}$ となり、酸・アルカリ洗浄した後活性炭を通して排出されている。

1. 2. 4 高度処理および汚泥処理工程

消化槽第 4 槽の上澄を再曝気し、第 2 沈殿槽で固液分離後、第 2 沈殿槽の上澄液に凝集剤（ポリ鉄）を混合し、浮上分離後、pH を調整し、T-N および T-P の基準値を満たすため、約 3.5 倍に水で希釈し放流している。汚泥の脱水はベルトプレス型脱水機を採用し、汚泥の含水率は $72 \sim 79\%$ で、全てコンポストの原料として用いられている。

1. 3 実験材料および方法

1. 3. 1 細菌類・酵母の分離および単離

1. 3. 1. 1 活性汚泥の採取

活性汚泥の採取は1993年12月下旬から1994年4月下旬にかけて伊那中央衛生センター好気性消化槽第1槽と第4槽流出水について各3回行った。

1. 3. 1. 2 細菌類・酵母の分離

分離培地はニュートリエントフラス(Oxid CM-1)8g、グルコース8g、乾燥酵母エキス0.5g、食塩6g、寒天(伊那食品BA-10)14gを蒸留水1000mlに溶解し、シャーレ(φ9cm)に20mlを分注し、120℃で15分間滅菌して調製した。pHは6.8~7.0であった。(以下この培地をA-培地、寒天を除いた場合B-培地と称する)。

分離操作の手順はFig.1-2に示した。槽内水を採取してから1時間以内に分離を行った。汚泥の破碎はフレンダー(25,000rpm)で10秒間処理した。分散した汚泥懸濁液(0.1ml)を滅菌した0.6%食塩水で 10^2 、 10^4 、 10^6 、 10^8 倍に希釈した。各希釈液0.1mlを平板培地に塗抹し、32℃で培養した。培地上に形成したコロニーを計数し、その値に希釈倍数を乗じて総細菌数とした。

1. 3. 1. 3 細菌類・酵母の単離

細菌類・酵母の単離は第1回目の分離からコロニー数が50~100個前後の平板培地を選んで行った。第2および第3回目はコロニーの検鏡および計数を行い、第1回目と異なった細菌のみを単離した。

細菌はコロニーの形、表面の形状と光沢、周縁、色および菌体の形状、大きさ、運動性、胞子の形成能などの特徴によって識別し、グループとして分けて数を計測した。細菌類・酵母の割合は全コロニーの平均値によって算出した。

なお、コロニーの観察は拡大鏡(10×)および実体顕微鏡を用いた。菌体の観察は位相差顕微鏡(600~1200倍)を用い、菌体の大きさは写真および顕微鏡の接眼マイクロメータによって測定した。胞子形成能はコロニーが出現して5~10日後、確認を行った。異なる菌株を全て単離し、A-培地から成る斜面培地(8ml)に保存した。斜面で増殖しにくいコロニーはA-培地から成る高層培地(寒天0.2%に調整する)で穿刺し、滅菌した流動パラフィンでシールした嫌気条件で培養を行った。複数の菌株が混じっている時にはさらに希釈法で分離し、純粋培養を行った。単離細菌は室温で保存し、以下に記述する生化学試験および種の同定に用いた。

1. 3. 2 単離細菌類・酵母の分類

1. 3. 2. 1 形態的性質

単離細菌の形態的性質は以下の項目および方法によって行った。

1) グラム染色は32℃、8~16時間培養した菌体をHucker変法¹⁰⁾に従って行った。

2) 細菌単離時点では胞子形成性が確認できない菌株はA-培地から成る斜面で1ヶ月培養した後、Bartholomew and Mittwerの方法¹⁰⁾に従って胞子染色を行った。胞子染色陽性を示した

顆粒は 85°C、15 分で孢子耐熱性テストを行った。85°C で耐熱性を示さない顆粒は 60°C、20 分間で再試験し、耐熱性を示したものを孢子と判定した。

3) A-培地で運動性を示さない菌株にはニュートリエントフ[®]ロス(Oxid No.2)0.8W/V%、食塩 0.6W/V%を含んだ液体培地を用い、4~12 時間振盪培養(60 回/分)した後、顕微鏡で再確認を行った。同組成の培地に寒天を 1.0%添加し、鞭毛染色の菌体の培養培地とした。菌体は 4~12 時間 32°C 培養した後、戸田法¹⁰⁾によって行った。

4) 嫌気性生育試験は培地および方法とも Bergey's Manual¹¹⁾に従った。

5) 生育温度は、32°C で 2 日間斜面で培養した栄養細胞を斜面に移植し、10°C、15°C、20°C および 40°C から 60°C まで 5°C 間隔で 24 時間培養し、菌体の増殖の有無によって確認した。

6) Parasporal crystals の形成性は菌株を斜面で 40°C、7 時間培養後、さらに 32°C、8~16 時間培養して自己消化中の菌体内の孢子以外の顆粒の有無によって判定した。

1. 3. 2. 2 生化学的性質

単離細菌の生化学的性質はメチルレッドテスト、V-P 反応、インドール生成、O-F テスト、硝酸塩の還元性、カタラーゼ⁺、オキシターゼ⁺、澱粉およびカゼインの加水分解試験を行った。実験方法は既知の方法¹⁰⁾¹²⁾に従った。

1. 3. 3 *Bacillus* sp. およびノカルシニア型細菌の種の同定

種の同定は形態的性質、生化学的性質および GC 含量を基に Bergey's Manual の *Bacillus* sp.¹¹⁾、ノカルシニア型細菌¹³⁾¹⁴⁾の項、The Prokaryotes の *Bacillus* sp.¹⁵⁾、ノカルシニア型細菌¹⁶⁾、Cellulomonadaceae 科細菌¹⁷⁾および Slepecky の表¹⁵⁾¹⁸⁾に従って行った。

1. 3. 3. 1 GC 含量の測定

菌体の培養はニュートリエント フロス(Oxid, CM-1) 4g、肉エキス10g、グルコース8g、食塩 6g を蒸留水 1000ml に溶解して用い、30°C で 4~10 日間培養した。*Bacillus* sp. は孢子形成直前まで振盪培養を行った。菌体は遠心分離 (8,000rpm. 5min) によって収集し、0.1N EDTA-0.15M NaCl 溶液で洗浄し、凍結保存した。

溶菌は次のようにして行った。孢子形成直前の菌体 (湿重量 1~2g) を 0.1M EDTA/0.15M NaCl 25ml に懸濁し、塩化リソチム¹⁹⁾²⁰⁾ 20~40mg を 1 時間毎に加えて 37°C で 3~10 時間保温した。粘度が上り、細胞壁が溶解した時点で、25% SDS (sodium dodecylsulfate) を加え 60°C、10 分間加熱して細胞を破壊した。

DNA の抽出は文献¹⁹⁾²⁰⁾に従って行った。クロホルム-イソアミルアルコール (24:1) を加え、室温で 30 分間振盪して除タンパクを行った。混液を遠心分離し、上層を 100ml ビーカーに移し、-20°C に冷却した 95% エタノールを静かに加え、ガラス棒で攪拌しながら DNA を巻取った。DNA が乾かないうちに 0.1N × SSC 9ml に移し、DNA が溶解した後 10N × SSC 1ml を加えた。DNA 溶液に熱処理したリボヌクレアーゼ A を最終

濃度が 50ug/ml になるように加え、37°C、30 分間保温し混在する RNA を分解した。クロホルム処理と遠心分離を行って除タンパクし、水層からエタノール沈澱で DNA を巻取り 0.1N×SSC 9ml に溶解させ、3M 酢酸ナトリウム-0.001M EDTA (pH 7.0) 1ml を加え、ガラス棒で撹拌しながらイソプロパノール 6ml を滴下して DNA を巻取り、0.1N×SSC に溶かし、透析処理後凍結保存した。

DNA の分解は DNA GC キット (ヤマサ醤油) を用い、精製した DNA 100uI を 100°C で 5 分間加熱し、0°C で急冷却した後、nuclease P 溶液 100uI を加え、50°C で 1 時間保温した。

G+C 含量の分析は高速液体クロマトグラフ装置 (島津製作所、ホソフ LC-9A、検出器 SPD-6A) を用い 270nm で検出し、カラムは AQ-312 (株ライオン、6.0x150mm) を用い²⁰⁾、10mM H₃PO₄-10mM MKH₂PO₄ (pH 3.5±0.01)²⁰⁾、流量 1.8ml/min で溶出した。データ処理はクロマトパック (島津 C-R6A) を用いて行った。タイプ株として *B. thuringiensis* IAM 12077 (ATCC 10792)、*B. megaterium* IAM 13418 (ATCC 14581)、*B. pumilus* IFO 12092 (ATCC 7061) および *B. subtilis* IFO 13719 (ATCC 6051) について HPLC 法による GC 含量の測定を行い文献値と比較し Tm 法、Bd 法と近似の値を示すことを確認した。誤差は測定値の -0.5%~+1.3% とした。

1. 3. 3. 2 MicroLog™ System による同定

従来法によって種の同定を行った *Bacillus* sp. について、各種炭素源の資化性による細菌同定法である Biolog 社 MicroLog™ 1 System および 2 System (ガンセイ産業) を用いて種の同定を試み、

同定の参考にした。ノカルシア型細菌については MicroLog™ System を用いて種を同定した。実験方法は所定の操作方法に従った。

1. 3. 4 細菌類・酵母の分解・資化性試験

し尿中の構成成分は主に炭水化物、タンパク質、脂質から成ると考えられる^{21~24})。そのモデルとして炭水化物はシヤカ^イ澱粉、蛋白質はククト^ミート、脂質は大豆油を用いた。これらに対する単離細菌類の資化性を検討した。

悪臭成分のモデルとして硫化水素、トリエチルアミンおよびアンモニアを用い、これらの分解性・利用によって脱臭能を判定した。また、硝酸イ^ノ利用性と脱窒性についても検討した。全ての試験は 32℃で行い、供試菌株は B-培地で 16 時間の前培養を行った。

単離細菌の分解性に関与する細菌の割合は下記の式によって計算した。

$$SR(\%) = [BR / (IN / IT)] \times (SB / IT) \times 100$$

ここで、SR は分解性に関与する細菌の割合、BR は総細菌数に占める菌株の割合、IN は単離菌株数、IT は単離菌株の総数、SB は分解を示す菌株数を表す。

1. 3. 4. 1 澱粉分解性試験

A-培地にシヤカ^イ澱粉 0.5% を添加した平板培地を用いた。単離菌株を 5 日間培養し、コロニー周辺に I₂-KI 溶液によって呈色されない透明帯が確認されたものを澱粉分解性細菌とした。

1. 3. 4. 2 油脂分解性試験

単離菌株は 92~95mg の大豆油を添加した B-培地 (6m l) で、30 回/分の振盪培養を行った。48 時間後、酢酸エチルで培養液から残存する大豆油を抽出した。酢酸エチルを溜去して残存する大豆油重量を計測し、はじめに加えた大豆油の重量から差引いて、減少した大豆油重量とした。なお、大豆油を加えない場合、酢酸エチル抽出物は 3mg 以下であった。

1. 3. 4. 3 蛋白質分解性試験

クックトミートの資化性試験は単離細菌の前培養懸濁液 0.1m l をクックトミート培地 (クックトミート(日水製薬)200mg+食塩水 6m l) に加え、30 回/分の振盪培養を行った。5 日後、残存のクックトミートを濾過・乾燥した後、元の重量から差引いて、SS の減少した量とした。比較するため、1991 年に単離したクックトミートの分解性菌株 2 株を供試した。予備実験により、クックトミート SS の減少率が 46%~48% 以下の時クックトミートの形状がそのまま残っていたので非可溶性とした。クックトミートが溶解し、SS の減少率が 48% 以上の場合は分解性とした。SS の減少率が 80% 以上ではクックトミートがほとんど溶解された。(Fig1-3)

1. 3. 4. 4 悪臭成分分解性試験

アンモニアとトリエチルアミンの利用性は文献に従って行った¹⁰⁾¹¹⁾。硫化水素の分解性試験は、各菌株を B-培地で 8~24 時間培養し、NaSH 水溶液を添加 (全体の 0.02% になるように) した後、さらに 60 分

間振盪培養(30回/分)を行い、酢酸鉛試験紙による呈色試験で判定した。

1. 3. 4. 5 脱窒性実験

脱窒性実験は駒形ら²⁵⁾の方法に従った。

1. 3. 5 単離細菌の生育試験

1. 3. 5. 1 世代時間の測定

世代時間はB-培地を用い、ハイオプロッター(660nm、東洋測器、30回/分振盪培養、32℃)によって自動測定し、時間に対する吸光度変化から算出した。

1. 3. 5. 2 金属イオンの添加による生育試験

Bacillus sp.およびノカルシア型細菌を数株を供試し、 Mg^{2+} 5mg/l単独での効果と Mg^{2+} 5mg/lとSi 10mg/l両者を添加した場合の効果を検討した。金属イオンの増殖への影響は増殖曲線から世代時間および指数期の短縮/延長および静止期における菌体濃度の増減から判定した。また、8~11時間後、顕微鏡で菌体の生育状況を観察した。 Mg^{2+} は $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を、蒸留水を加えて1,200mg/lに調整して添加し、Siは珪酸を蒸留水で溶解し滅菌して添加した。ICP発光分析(島津製作所 ICPS-1000Tr)によって濃度を測定した。

基本培地はB-培地を用いた。金属イオン添加と無添加培地の基本成分の濃度を同一にするため、あらかじめ濃厚な培地を調整し、

前培養した菌液(0.05m^l)と目的の濃度となるよう金属イオンを添加した。イオン無添加の場合同量の蒸留水を加えた。測定方法は世代時間の測定と同様であった。

1. 3. 5. 3 し尿寒天培地による生育試験

し尿寒天培地は次のように調製した。貯留槽から採取した破碎後のし尿を煮沸し、30分間発泡させた。寒天14W/V%を水道水に懸濁して加え、さらに煮沸した。寒天が溶解した後、シャーレに20m^lずつ分注して平面とした。調製したし尿寒天培地は105℃、20分間滅菌を行った。単離菌株はし尿寒天培地で2~7日間培養後、コロニーの観察と検鏡を行った。生育性を示さない菌株について生育性の菌株と混合して培養し、生育性を検討した。

1. 4 結果

1. 4. 1 総細菌数

10⁶倍希釈平板上にコロニー数が100個前後出現したので、計数用に適した希釈段階とした。Table 1-2a、1-2bに消化槽第1槽と第4槽流出水から検出したコロニー数を示した。総細菌数は第1槽流出水で6x10⁸~1x10⁹個/m^l、第4槽流出水で4x10⁸~3x10⁹個/m^lであった。第1槽と第4槽の総細菌数は大きい差異が見られなかった。

1. 4. 2 細菌類・酵母の単離

細菌類・酵母は Table 1-2a、1-2b に示したように 6 つのグループに分けた。桿菌は大きさから $1\ \mu\text{m}$ 以上、 $0.5\sim 1\ \mu\text{m}$ および $0.5\ \mu\text{m}$ 以下に分けてそれぞれ 28 株、45 株、81 株を単離した。

ノカルシア型細菌^{26~28)}は特有の分岐したフィラメントを形成し、桿菌様や T 字様菌体に変化することによって分類し (Fig. 1-4)、第 1 槽から 10 株を単離し、その内の 2 株は第 4 槽からも検出された。

球菌は栄養細胞が円形を示したことによって分類した。第 1 槽から 10 株を単離し、その内の 3 株を第 4 槽からも検出した。

酵母類は 2 株単離し、菌体の径は約 $4\sim 6\ \mu\text{m}$ の球状で出芽することから確認した。

1. 4. 3 桿菌の分類

1. 4. 3. 1 内生孢子形成性桿菌の分類

$1\ \mu\text{m}$ 以上 28 株、 $0.5\sim 1\ \mu\text{m}$ 45 株の単離菌株は好気性、グラム陽性、内生孢子形成性、カタラーゼ生産性、運動性、周毛性を示し *Bacillus* sp. であった²⁹⁾³⁰⁾。以下、それぞれ *Bacillus* I、*Bacillus* II と称する。 $0.5\ \mu\text{m}$ 以下の桿菌 81 株の内 34 株は好気性、グラム陽性であり、孢子染色で陽性を示した。顆粒の耐熱性は $70^\circ\text{C}\cdot 15$ 分の菌株 11 株、 $65^\circ\text{C}\cdot 15$ 分の菌株 22 株、 $60^\circ\text{C}\cdot 20$ 分の菌株 1 株であった。これらの顆粒の耐熱性は $60\sim 70^\circ\text{C}$ で *Bacillus* sp. の孢子の耐熱性より低かったが、その他の性質は *Bacillus* sp. と一致したので *Bacillus* sp. と分類した。以下 *Bacillus* III と称する。マラカイトグリーンで染色される顆粒を形成するが、 $60^\circ\text{C}\cdot 20$ 分で耐

熱性を示さない菌株をグラム陽性細菌としてまとめた。*Bacillus* I、*Bacillus* II および *Bacillus* III に属する一部菌株は第4槽で単離できなかった (Table 1-3)。

1. 4. 3. 2 内生孢子非形成性および嫌気性生育性桿菌 の分類

0.5 μ m 以下の桿菌の内、好気性、胞子を形成せず、グラム染色で陽性を示した桿菌 (非耐熱性顆粒形成性菌体を含む) をグラム陽性桿菌としてまとめた。第1槽から17株を単離し、この内の7株を第4槽からも検出した。

グラム染色で陰性を示した桿菌をグラム陰性の桿菌として分けた。第1槽から18株を単離し、この内の8株を第4槽からも検出した (Table 1-3、1-6)。

残りの11株は高層培地で旺盛な生育を示し、グラム陽性、特有の孢子嚢 (Fig. 1-5) を形成したので *Clostridium* sp.³¹⁾³²⁾ と分類した。11株を第1槽で単離し、第4槽からその内のNo.2株のみを単離した。単離初期には大気中で生育可能であったが、その後生育できなくなった。糞便から *Clostridium* sp. が単離されており³¹⁾、ここで単離された *Clostridium* sp. も投入されたし尿中に存在し、処理が進むにつれて菌体数が減少したと考えられる。

1. 4. 4 優占細菌の割合

優占細菌の割合は Table 1-3 に示した。第1槽と第4槽で検出した菌株を平均すると *Bacillus* sp. 43%~77%、ノカルシア型細菌 5%

～18%、グラム陽性桿菌 12%～27%、グラム陰性細菌 2%～16%、球菌 2%および *Clostridium* sp. 1%～3%であった。酵母は 1%以下であった。*Bacillus* sp. の割合は第 1 槽と第 4 槽でほぼ同数であった。第 4 槽ではノカルシア型細菌がやや減少し、グラム陽性桿菌の割合は 27%まで増加し、グラム陰性桿菌の割合は 16%まで増加した。*Bacillus* sp. とノカルシア型細菌は合計すると最高 95%を占めた。

1. 4. 5 *Bacillus* sp. および *Nocardia* 型細菌の種の同定

1. 4. 5. 1 *Bacillus* I に属する種の同定

Bacillus I の形態生理的性質および GC 含量は Table 1-4a に示した。*Bacillus* I に属する 28 株の内、3 株は継代培養中に増殖できなくなり、同定できなかった。

菌株 No. 2～8、No. 10 および No. 14 の 9 株は V-P 反応陽性、運動性を示し、parasporal crystal 形成性 (Fig 1-6)、嫌気生育性、GC 含量は 35%～39%であって *B. thuringiensis* と同定した¹¹⁾¹⁵⁾。MicrologTM 1 System による同定結果は *B. thuringiensis/cereus* と一致した。菌株 No. 13 は parasporal crystal 形成性を示し、運動性・嫌気性生育性、V-P 反応陰性、アンモニア利用性⁹⁾を示し、GC 含量は 36.3%であって *B. thuringiensis* と *B. megaterium* の両者の性質を示した。MicrologTM 1 System による同定では、No. 13 株は *B. mycoides* と一致した。しかし、*B. mycoides* は運動性を示さず parasporal crystals を形成しないので菌株 No. 13 を *B. thuringiensis/megaterium* と同定した。この菌株は炭水化物の資化性では *B. mycoides* に近い性質を有すると考えられた。

菌株 No.16、No.18、No.19 および No.22 の 4 株は運動性を示し、parasporal crystals を形成せず、V-P 反応陰性、嫌気性で生育せず、アンモニア利用性を示したので *B. megaterium*¹¹⁾¹⁵⁾ と同定した。GC 含量は菌株 No.22 を除いて 37%~43% で、*B. megaterium* の文献値 (36.5%~47%)¹¹⁾¹⁵⁾ と一致した。菌株 No.22 は GC 含量が 2% 低く、*B. cereus* の可能性も考えられるので *B. megaterium/cereus* と同定した。Microlog™ 1 System を用いた結果ではこれら 3 株および菌株 No.22 は *B. megaterium* に一致した。

菌株 No.1、No.9、No.11、No.12、No.15、No.17、No.20、No.21、No.26~No.28 の 11 株は運動性を示し、parasporal crystals を形成せず V-P 反応陽性、嫌気性生育性を示したので、*B. cereus* と同定した。GC 含量は菌株 No.11 を除き 35%~37% であり *B. cereus* の文献値 (31.7%~40.1%)¹¹⁾¹⁵⁾ と一致した。Microlog™ 1 System によると菌株 No.17 を除き *B. cereus/thuringiensis* に一致した。菌株 No.17 はこの System による同定では *B. mycooides* に一致したが、*B. mycooides* は運動性を示さない¹¹⁾¹⁵⁾ ため *B. cereus* と同定した。菌株 No.11 は GC 含量が *B. cereus* の文献値より 2% 高く、*B. thuringiensis* の可能性もあるので *B. cereus/thuringiensis* とした。

以上により *Bacillus* 1 に属する種の同定を行った。しかし、これらの菌株は下記の性質がタイプ株と異なっていた。

- 1) 一般に *B. cereus* はオキシタ⁺-セ⁻非生産性を示すことが知られている¹¹⁾が、*B. cereus* と同定した 10 株の内、菌株 No.26 を除く 9 株はオキシタ⁺-セ⁻生産性を示した。

2) *B. thuringiensis* と *B. cereus* の大多数が *B. megaterium* の性質であるアノモア利用性を示した。

3) *B. megaterium* と同定した菌株は澱粉可溶化能を示さず、また、*B. thuringiensis*、*B. cereus* と同定した菌株にも澱粉可溶化能を示さない菌株が存在した。

その他の生化学的性質、GC 含量および Microlog™ 1 System の結果から Table 1-4a に示すように同定した。*Bacillus* I の菌株では、従来法による同定結果と Microlog™ 1 System による同定結果は 2 株以外一致した。

1. 4. 5. 2 *Bacillus* II に属する種の同定

Bacillus II の形態生理的性質および GC 含量は Table 1-4b に示した。*Bacillus* II に属する 45 株の内、6 株が継代培養中に増殖できなくなり、No.40 株は DNA の単離ができず、同定できなかった。また、菌株 No.27、No.29 および No.30 は GC 含量が 55% ~ 56% であり、胞子は円形であった。文献¹¹⁾¹⁵⁾には相当する種が見られなかった。

残る 35 株は V-P 反応陽性、胞子が楕円型で胞子囊の膨潤が見られず、嫌気性で生育せず、大多数の生育温度は 15~50℃であったことから *B. pumilus* または *B. subtilis*¹¹⁾¹⁵⁾¹⁸⁾ に属していると考えられた。そのうちカゼインおよび澱粉分解性を示した菌株 No.6、No.10、No.11、No.18、No.20、No.25、No.26、No.33 の 8 株は *B. subtilis* と同定した。これら 8 株の GC 含量は 42%~47% であり、*B. subtilis* の文献値 (41.5%~47.5%)¹¹⁾¹⁵⁾ と一致した。

Microlog™ 1 System による同定では、菌株 No.11 は *B.subtilis* と同定された。菌株 No.25 および No.26 は *B.megaterium* と同定されたが、大きさおよび V-P 反応から *B.megaterium* ではなく *B.subtilis* と同定した。同 System による同定では菌株 No.6 は *B.licheniformis* と同定された。*B.licheniformis* は嫌気性で生育するが、菌株 No.6 は生育しないので *B.licheniformis* ではなく *B.subtilis* と同定した。

残りの 27 株の内、菌株 No.22、No.28、No.31 および No.35 を除く 23 株は V-P 反応陽性、嫌気性非生育性、カゼイン・クワクトミート可溶化能を示し、澱粉非可溶化能を示し、GC 含量は 40%~46% であつたので *B.pumilus*¹¹⁾¹⁵⁾ と同定した。Microlog™ 1 System による同定では菌株 No.1 および No.2 は *B.licheniformis* と同定され、菌株 No.14 は *B.brevis* と同定された。しかし、菌株 No.1 および No.2 は嫌気性非生育性で澱粉非分解性を示すので *B.licheniformis*¹¹⁾¹⁵⁾ ではなく *B.pumilus* と同定した。菌株 No.14 は V-P 反応陽性を示すので *B.brevis*¹¹⁾¹⁵⁾ ではなく *B.pumilus* と同定した。さらに、*B.pumilus* と同定した菌株を Microlog™ 1 System を用いて同定を行ったところ、菌株 No.19 および No.38 は *B.megaterium*、菌株 No.39 は *B.subtilis* と同定された。これらのことから、単離した *B.pumilus* は炭水化物の資化性では *B.licheniformis*、*B.megaterium*、*B.subtilis* 等と似た代謝系を有すると推定される。また、*Bacillus* II のクワクトミート分解性桿菌は *B.licheniformis*、*B.pumilus* および *B.subtilis* の性質を有すると考えられた。

菌株 No.22、No.28、No.31 および No.35 の 4 株は V-P 反応陽性、嫌気性非生育性を示し、澱粉・セルロースの加水分解能を示さなかったが⁹⁾、GC 含量は 41%~42% であって *B.pumilus*、*B.subtilis* の GC 含量と一致した。この 4 株を *B.pumilus* または、*B.subtilis* と同定した。なお、*B.pumilus* は硝酸イオン利用性を示さないことが知られているが¹¹⁾、ここに同定した *B.pumilus* の多くが硝酸イオン利用性を示した点が *B.subtilis*、*B.licheniformis* に近い性質¹¹⁾を示した。

1. 4. 5. 3 *Bacillus* III の種の同定

Bacillus III の形態生理的性質および GC 含量は Table 1-4c に示した。

Bacillus III に属する菌株は 34 株であり、その内の 5 株は継代培養中に増殖できなくなり、同定できなかった。走査電子顕微鏡(日本電子(株)、JSM-6300)による観察では胞子は円型であった(Fig1-7)。ほとんどの菌株はオキシダーゼおよびカタラーゼ生産性、V-P 反応陰性を示し、グルコースから酸の生産性を示さなかった。また、セルロースおよび澱粉の可溶化能を示さず、生育最高温度は 40°C であった。生化学的諸性質や胞子の形状からこれらの菌株は *B.sphaericus* と *B.schlegelii*¹¹⁾ の可能性が考えられた。GC 含量は菌株 No.1、No.4、No.11 および No.22 を除く 26 株は 62%~69% であり、*B.schlegelii* の文献値(63.9%~67.7%)¹¹⁾¹⁵⁾ とほぼ一致したので、最高生育温度は *B.sphaericus* に近似していたが¹¹⁾¹⁵⁾ *B.schlegelii* と同定した。

Microlog™ 1 System には *B. schlegelii* の同定に関するデータは含まれていないが、一部の菌株についてこの同定法を試みたところ、相同性を満足する *Bacillus* sp. の菌株は見られなかった。このことはこれらの菌株が *B. schlegelii* である可能性が高いことを示していた。

GC 含量が 55%~58% である菌株 No.1、No.4、No.11 および No.22 の 4 株は文献に相当する種がいなかったため同定できなかった。これら 4 株は GC 含量や胞子の形状から *Bacillus* II に属する菌株 No.27、No.29 および No.30 の 3 株と関係あると考えられる。

1. 4. 5. 4 ノカルシア型細菌の種の同定

ノカルシア型細菌の形態生理的性質および GC 含量は Table 1-5 に示した。単離したノカルシア型細菌はマラカイトグリーンで染色される顆粒を形成し、乾燥状態で 1 年間保存した後栄養培地に接種するとこの顆粒から栄養細胞が再生したが、60℃・20 分で死滅した。胞子は耐熱性を示さないのので胞子様顆粒として表示した。菌株 No.4 および No.6~No.10 の桿菌様の菌体は運動性を示したので *Oerskovia* sp.²⁶⁾²⁷⁾ と分類した。これら 6 株の GC 含量は 68%~73% であって、*Oerskovia* sp. の文献値¹¹⁾¹⁵⁾ とほぼ一致した。Microlog™ System による同定では、これら 6 株は全て *O. turbata*¹³⁾¹⁴⁾¹⁷⁾ と一致した。菌株 No.2 株および No.5 は運動性を示さないが、Microlog™ System による同定では *O. turbata* に一致した。菌株 No.1 および No.3 は堅いコロニーを形成するため、Microlog™ System で同定できず、種の決定に至らなかった。

1. 4. 5. 5 球菌類の同定

Table 1-5に単離した球菌の形態学的、生化学的性質を示した。これらは好気性、グラム陽性を示し、菌株 No.4 および No.9 以外の8株の径が $1\ \mu\text{m}$ 以上であった。6ヶ月後菌株 No.1、No.3 および No.10のみ継代培養可能であったが、他の菌株は新鮮な培地でも増殖せず死滅した。菌株 No.1はカタラーゼ⁺生産性、グルコースによる O/Fテストで陰性を示し、G+C含量は46%であったことから *Planococcus* sp.と同定した³³⁾。菌株 No.3 および No.10はカタラーゼ⁺生産性、グルコースによる O/Fテストで陰性を示し、G+C含量はそれぞれ69%、67%であったので *Deinococcus* sp.³³⁾と同定した。

1. 4. 6 単離細菌類の分解資化性

1. 4. 6. 1 澱粉、ククト⁺ミート、大豆油の分解・資化性

に關与する細菌

単離細菌の生化学的性質は Table 1-4a~1-4c、1-5 および 1-6 に示した。澱粉、ククト⁺ミート、大豆油の分解資化性に關与する優占細菌の割合はそれぞれ24、31、66%であった (Table 1-7a)。

澱粉分解は主に *O.turbata* と *B.subtilis* が担っていた。単離した *O.turbata* と *B.subtilis* は全て澱粉分解性を示した。その他は *B.cereus*、*B.schlegelii*、*B.thuringiensis*、グラム陽性桿菌および一部の種未同定 *Bacillus* sp.も關与した。*O.turbata* の澱粉分解した径とコロニーの比は他菌株より著しく大きいため、澱粉分解活性が最も強いと推測した。

クックトミートの分解は *B. pumilus* と *B. subtilis* が重要であり、両者合計 35 菌株を単離し 80% の単離菌株が分解性を示した。ほとんどの菌株は 200mg/6ml のクックトミートを 5 日間で完全に可溶化した。その他 *B. thuringiensis*、*B. megaterium*、*B. cereus*、*B. schlegelii*、種未同定 *Bacillus* sp.、*O. turbata*、グラム陽性桿菌も分解性を示した。

大豆油の分解は *B. pumilus*、*B. schlegelii*、*O. turbata*、グラム陽性桿菌、*B. subtilis*、*B. thuringiensis*、*B. megaterium*、*B. cereus*、*Planococcus* sp.、*Deinococcus* sp. などが関係していた。単離した *Bacillus* sp. と *Oerskovia* sp. の内約 50% の菌株が分解性を示した。*O. turbata* の最高大豆油分解量は 19mg/6ml・48hr であった。*B. schlegelii* および *B. pumilus* の最高大豆油分解量はそれぞれ 16mg/6ml・48hr、11mg/6ml・48hr であった。

1. 4. 6. 2 悪臭成分の分解利用性に関する細菌

H₂S、NH₃、トリエチルアミン分解性に関与する優占細菌の割合はそれぞれ 52%、41%、49% であった (Table 1-7b)。

H₂S の分解性は主に *B. subtilis*、*B. pumilus*、*O. turbata* が関係していた。NH₃ の利用性も *B. subtilis*、*B. pumilus*、*O. turbata* が重要であった。その他、*B. thuringiensis*、*B. megaterium*、*B. cereus*、*B. schlegelii*、*O. turbata*、グラム陽性桿菌およびグラム陰性桿菌の一部も悪臭成分利用性を示した。

1. 4. 6. 3 脱窒性に関与する細菌

脱窒性に関与する優占細菌の割合は15%であって主に *B. schlegelii* およびグラム陽性細菌類が関係していた (Table 1-7b)。

1. 4. 7 単離細菌の生育性

1. 4. 7. 1 世代時間

澱粉、ククト[®]ミート分解性が優れた *Bacillus* sp. の世代時間は20~45分の間であった (Table 1-4a)。澱粉分解性を示した単離細菌の内 *B. cereus/thuringiensis* (菌株 No.11) は振盪培養中に菌体が試験管の壁に付着し、正確な値が得られず、また、*O. turbata* は菌体の沈降性がよく正確な世代時間の測定が困難であった (Table 1-4b)。特に菌株 No.3 は塊となり最も沈降性がよかった。*B. schlegelii*、グラム陽性桿菌、グラム陰性桿菌は世代時間が全般的に長かった (Table 1-4c、Table 1-6)。球菌に属する菌株の内、菌株 No.4、No.5、No.6 および No.8 は世代時間が短かった (Table 1-6)。*Clostridium* sp. および酵母の世代時間は測定できなかった。

1. 4. 7. 2 金属イオンの添加に及ぼす影響

Fig 1-8 に *Bacillus* I に属する菌株に対する金属イオンの添加による生育曲線を示した。菌株 No:1 (*B. cereus*) は培養してから約2.5時間前後、菌株のOD値は Mg^{2+} または、 $Mg^{2+}+Si$ を添加した場合、無添加よりOD値が低かった。また、菌株 No:13 (*B. thuringiensis*) は培養してから12時間後、金属イオン無添加の場合はODの値が1.29の時、 Mg^{2+} 添加すると約1.14となり、菌

体の濃度の上昇が阻害された。Table 1-8 に示したように菌株 No.1、No.2 および No.3 は Mg^{2+} または、 Mg^{2+} と Si を添加した場合は指数期に差異がなかったが、世代時間が 12~28% 延長された。菌株 13 は Mg^{2+} または、 Mg^{2+} と Si を添加した場合は世代時間が 21~39% 延長し、指数期が 0.5~1 時間短縮したため、菌体濃度は金属イオン添加で低くなった。これらの菌株は培養して 8 時間後、金属イオン無添加でフィラメントの切断が見られた。1991 年に単離した *B.thuringiensis* は金属イオンの添加で増殖が促進され、今回の単離菌株と異なった⁸⁾。

Fig 1-9 に *Bacillus* II に属する菌株の金属イオンの添加に及ぼす生育曲線を示した。菌株 No:6 (*B.pumilus*) は金属イオン無添加培地で 4.5 時間培養した後、生育速度が低下した。一方、金属イオンを添加した場合は増殖を続け、指数期は金属イオン無添加より 2~3 時間長かった。菌株 No:18 (*B.subtilis*) は培養してから約 3.5 時間後、金属イオンを添加した場合は菌株 No:6 と同様な生育促進効果を示した (Fig 1-9(b))。Table 1-8 に示したように Mg^{2+} または、 Mg^{2+} と Si を添加すると無添加の場合に比べて世代時間の短縮には顕著な効果を示さなかったが、指数期の延長によって菌体濃度が高くなった。OD 値が無添加の場合に 1.00~1.07 を示し、 Mg^{2+} を添加した場合は 1.03~1.28、 Mg^{2+} と Si を混合して添加すると 1.08~1.28 を示した。Fig 1-10 は菌株 No:6 が Mg^{2+} または Mg^{2+} と Si を混合して 8 時間後の生育状況を示した。無添加培地で培養すると菌体が 8 時間以上フィラメント状態を継続した。 Mg^{2+} ま

たは、 Mg^{2+} と Si を添加するとフィラメントが切断され、フィラメントの形成を阻害する効果を示した。

Fig 1-11 は *O.turbata* に対する金属イオンの添加に及ぼす生育曲線の変化を示し、金属イオンの添加は菌体の濃度を高める効果を示した。無添加の場合に OD 値が 1.0 を示し、 Mg^{2+} と Si を混合して添加すると 1.33 まで高まった (Table 1-8)。

1. 4. 7. 3 し尿寒天培地による生育

し尿寒天培地に多くの単離菌株が 4~24 時間で増殖した。(Fig 1-12)。し尿寒天培地で生育性を示した菌株は単離した *Bacillus sp.* の内 83%、*O.turbata* の内 90%であった。グラム陽性桿菌、グラム陰性桿菌および球菌はそれぞれ 77%、94%、40%であった。これらの菌株は単独で旺盛な生育性を示し、混合するとさらに旺盛な生育性を示した。以上から単離細菌がし尿中に含まれている澱粉、蛋白質および油脂の分解に関与していると考えられ、澱粉、蛋白質および油脂分解性を示さない菌株はし尿の可溶性成分を利用していると推測した。

1. 5 考察

1. 5. 1 細菌相の変化

1991年には *B.thuringiensis* および *B.pumilus* はそれぞれ 46%、42%を占め、*B.megaterium* および *B.subtilis* も含まれていた⁹⁾。1994年では *Bacillus sp.* および *O.turbata* を合計した細菌数は全細菌数の最高 95%を占めた (Table 1-3)。 *B.thuringiensis* が大幅

に減少し、*B.schlegelii*、*O.turbata* およびグラム陽性桿菌などが多く検出され、細菌の構成が1991年と異なっていた。

活性汚泥細菌の総細菌数が1991年より1/10に減少した。このことは優占細菌の半数を占めていた*B.thuringiensis*が大幅に減少したことに関係していると考えられた。一方、*O.turbata*が1991年より大幅に増加した。これらは澱粉可溶化能が強いため、澱粉分解性*B.thuringiensis*の減少と*O.turbata*の増加と何らかの関連性があるものと推察した。

1. 5. 2 *Bacillus* sp.と*O.turbata*の高濃度維持について

Bacillus sp.と*O.turbata*が高濃度維持されているのは*Bacillus* sp.は胞子を形成すること、*O.turbata*は乾燥状態でも生存することから、何れも処理が進むにつれて引き起こされる貧栄養状態で生存可能であり、これらの胞子および栄養細胞が汚泥返送によって菌体濃度は高く維持されていると考えられる。グラム陽性桿菌とグラム陰性桿菌が第4槽で増加していたのは*Bacillus* sp.がこの時点で胞子化して自己消化し、栄養分を流出したり各種酵素の放出によって汚泥吸着成分が分解したりして栄養源がわずかに増加するためと考えられた。

1. 5. 3 し尿処理がより効率的となった要因について

Table 1-7a に示すように澱粉分解性細菌は1991年には*B.megaterium*、*B.thuringiensis*および*B.subtilis*であった⁹⁾。1994年には*O.turbata*と*B.subtilis*が重要となった。分解性細

菌数の割合は1994年では1991年より少なくなっているが、*O.turbata*の澱粉分解能が*B.thuringiensis*より強いため、1994年における澱粉分解性は全体としてより強くなっていると考えられた。

蛋白質分解性に関係した細菌は1991年⁹⁾と1994年³⁴⁾³⁵⁾では何れも*B.pumilus*および*B.subtilis*が重要であった。しかし、単離菌株の分解性を比較すると1991年に単離した菌株では200mg/6mlのクックト[®]ミートの可溶化は7日間かかったのに対して1994年では可溶化に必要な日数が5日間に短縮され(Fig. 1-13)、蛋白質分解能は強くなっていることが判明した。また、MicrologTM 1 Systemの結果から、炭水化物の資化性では1994年に単離された*B.pumilus*は*B.brevis*、*B.licheniformis*、*B.megaterium*および*B.subtilis*の性質を、*B.subtilis*は*B.licheniformis*および*B.megaterium*の性質を有している。これらの細菌が蛋白質と澱粉の可溶化にのみ関係しているのではなく、種々の糖の資化にも幅広く関係していることを示唆した。

油脂分解性に関係した菌株は1991年には*B.thuringiensis*と*B.pumilus*であった⁹⁾が1994年には³⁴⁾³⁵⁾*B.pumilus*、*B.subtilis*、*B.schlegelii*および*O.turbata*であった(Table 1-3)。さらに、グラム陽性の細菌類も関係し³⁴⁾³⁵⁾、脂質の資化に関係した菌株は多様化していた。

悪臭成分分解・利用性に関係する細菌については1991年⁹⁾と1994年³⁴⁾³⁵⁾に単離された菌株の全ての種が硫化水素とトリエチルアミンの分解・資化に関係したが、1994年には、関係する優占細菌相

がより複雑となっていた。また、アンモニア利用性に関係した細菌は1991年には主として *B. thuringiensis* が関係し⁹⁾、*B. pumilus* は関係していなかったが、1994年には *B. pumilus*、*B. subtilis* および *O. turbata* が主として関係し³⁴⁾³⁵⁾(Table 1-7a)、アンモニア利用性の細菌相は多様化していた。

脱窒性に関係した細菌については1991年には主に *B. pumilus* が関係していたが⁷⁾⁹⁾、1994年には *B. pumilus* はほとんど関係せず *B. schlegelii* およびグラム陽性桿菌が関係していた³⁴⁾³⁵⁾(Table 1-3)。1994年には脱窒に関係する細菌数の割合は減少しているが³⁴⁾³⁵⁾(Table 1-7b)、*B. schlegelii* の脱窒試験で、窒素ガスがパラフィン層を通過して気散する程多量に見られ、1991年における *B. pumilus* に見られた脱窒能⁹⁾³⁴⁾よりはるかに強かった。このため、1994年の脱窒能は細菌数の割合から推定されるより強いことが推定された。

以上から蛋白質分解性に関係した *B. pumilus* の分解能がより強くなり、*O. turbata* の増加によって炭水化物と油脂資化性がより高くなったと考えられ、*B. schlegelii* の出現によって油脂の分解性・利用性および脱窒性が1994年には高まっていたと考えられた。さらに、澱粉分解性、油脂分解性、悪臭成分分解性・利用性および脱窒性に関係した細菌相は多様化した。このような変化はし尿処理がより効率化になった重要な要因であると考えられた。また、*B. pumilus*、*B. subtilis* および *O. turbata* に対して Mg^{2+} と Si を添加して培養すると濃度が上昇することが判っ

た。これらの細菌を高濃度に維持すると共に、し尿の分解活動を高める効果があることを再確認した。

1. 6 要約

- 1) 1994年の優占細菌相は *Bacillus* sp. および *Oerskovia* sp. が処理に最も重要であり、無臭し尿処理に関与していることが明らかになった。これらは最高 95% を占めた。 *Bacillus* sp. は *B. pumilus*、*B. subtilis*、*B. schlegelii*、*B. cereus*、*B. megaterium*、*B. thuringiensis* からなり、*Oerskovia* sp. は *O. turbata* から構成されていた。
- 2) 1991年の優占細菌には *B. thuringiensis* は 46% を占めていた。1994年では *B. thuringiensis* が約 1.4% まで減少し、*B. schlegelii*、*B. subtilis*、*O. turbata* およびグラム陽性桿菌などが大幅に増加し、優占細菌の構成が変化していた。
- 3) 1991年に単離した *B. thuringiensis* は澱粉、脂質および硫化水素、アンモニアの分解性資化性を担っていた。一方、1994年には澱粉の分解は *O. turbata* および *B. subtilis*、脂質の分解は *O. turbata*、*B. schlegelii* およびグラム陽性桿菌に分担され、分解能も優れていた。また、1994年に単離した *B. pumilus* および *B. subtilis* は 1991年に単離したものより強い分解能を示し、硫化水素、アンモニアの分解性も示した。このような変化によって 1991年より良好な処理が得られる一因と推測した。
- 4) 単離細菌がし尿寒天培地で生育性を示し、これらはし尿の分解あるいは、可溶性成分の利用に関与すると考えられた。

5) *B. subtilis*、*B. pumilus* および *O. turbata* は Mg と Si の添加によって細菌濃度が高まった。また、*B. subtilis* および *B. pumilus* はフィラメントの切断効果を有することを再確認した。このようにこれらの細菌を高濃度に維持することは曝気量と汚泥返送量に加えて Mg と Si の添加が必要であることを再確認した。

Table 1-1. Charged volume of night soil and the quality of treated water from 1991 to 1994 at Inachuo Sanitation Center.

	1991		1992		1992		1993		1994	
	Nov.	Dec.	Jan	Nov.	Dec.	Jan	Nov.	Dec.	Jan	
Night soil loading(m³)^a										
volume/month ^b	6367	6856	5413	6387	6862	5439	6541	7235	5579	
maximum volume/day ^c	258	282	245	266	363	239	310	446	353	
average volume/day	212	246	202	213	249	210	256	310	302	
Removal sludge(m³)										
dewatered volume	1852	2203	2100	2044	2494	2732	2875	3350	2394	
dewatered cake;79% H ₂ O	136	170	150	167	187	197	190	192	153	
Quality of discharged water(mg/l)										
SS	1	3	2	2	2	1	2	1	3	
BOD	1.1	1.2	0.9	0.7	2.2	2.3	1.4	0.5	0.6	
COD	197	23	17	10	17	19	12	3	10	
T-N	40	25	31	12	14	51	63	19	21	
Ammonia-N	8	11	27	10	-	10	33	-	10	
Number of coliform group	1	11	2	7	1	2	1	1	0	

Although the loading volume increased in 1993, the treated water-quality was retained.

a) ratio of night soil to excess sewerage sludge = 89:11.

b) 24 to 25 days-operation/month till Jan. 1993, and 20 days/month from Nov. 1993 to Jan. 1994.

c) specification : 200 K//day.

1991-1992 : MLSS : 6100-7250 mg// ; BOD volume loading : 0.513Kg/m³·day
BOD-MLSS : 0.075Kg/KgMLSS/day.

1993-1994 : MLSS : 7283-9050 mg// ; BOD volume loading : 0.725Kg/m³·day
BOD-MLSS : 0.106Kg/KgMLSS/day.

Table 1-2(a). Number of microorganisms detected from the first aerobic digestion tank.

No of plates	Rod (μm)			Nocardioform bacteria	Cocci	Yeast	Amount II
	>1	0.5~1	<0.5				
1.1	2	35	38	15	1	0	91
1.2	5	54	56	16	0	0	131
1.3	1	29	21	11	0	0	62 a
1.4	3	32	34	17	0	0	86
1.5	2	25	26	19	0	0	72
1.6	1	21	23	18	1	1	65
1.7	2	56	57	18	0	0	133 b
1.8	1	38	43	16	0	0	98
2.1	7	32	37	9	4	0	89
2.2	9	38	41	12	2	0	102
2.3	4	28	31	10	3	1	77
2.4	3	48	51	13	3	0	118
2.5	2	28	30	6	2	0	68
2.6	1	25	28	8	1	0	63
2.7	4	32	34	5	2	0	77
2.8	7	41	43	11	1	2	105
2.9	12	40	44	10	3	0	109
3.1	1	33	39	16	3	0	92
3.2	2	27	40	18	4	0	91
3.3	5	34	34	9	0	0	82
3.4	2	40	41	11	3	0	97
3.5	3	25	35	9	1	0	73
3.6	2	42	42	11	2	0	99
3.7	3	46	52	19	1	0	121
3.8	4	45	46	17	2	0	114
3.9	2	47	49	10	2	0	110
Amount I	90	941	1015	334	41	4	2425
Percent	4%	39%	42%	14%	2%	0.2%	100%

a , The lowest number of colonies detected

b , The highest number of colonies detected

The number of bacteria = $a \times 10^6 \sim b \times 10^6$ cfu/m/

Percent = Amount I / 2425 \times 100

Table 1-2(b). Number of microorganisms detected from the fourth aerobic digestion tank.

No of plates	Rod (μm)			Nocardioform bacteria	Cocci	Yeast	Amount II
	>1	0.5~1	<0.5				
1.1	3	66	50	11	5	4	139
1.2	2	56	49	8	3	1	119
1.3	1	25	25	3	0	0	54
1.4	2	71	59	16	4	1	153
1.5	1	59	72	15	2	0	149
1.6	3	62	193	12	7	2	279 b
1.7	2	52	34	12	1	0	101
1.8	4	51	91	15	6	2	169
2.1	1	32	66	3	2	0	104
2.2	2	16	42	2	3	0	65
2.3	2	37	83	2	1	0	125
2.4	1	45	65	2	1	0	114
2.5	2	21	44	6	2	0	75
2.6	2	24	45	4	1	0	76
2.7	0	22	61	11	1	0	95
2.8	3	25	58	6	1	0	93
2.9	2	28	64	8	2	0	104
3.1	3	26	7	3	0	0	39 a
3.2	4	28	11	2	1	0	46
3.3	4	17	32	2	2	0	57
3.4	1	16	17	8	1	1	44
3.5	4	34	29	10	0	0	77
Amount II	49	813	1197	161	46	11	2277
Percent	2%	36%	53%	7%	2%	0.5%	100%

a, The lowest number of colonies detected

b, The highest number of colonies detected

The number of bacteria = $a \times 10^6 \sim b \times 10^6$ cfu/m/

Percent = Amount I / 2277 \times 100

Table 1-3. Ratio of microorganisms detected in aerobic digestion in 1994.

bacteria	size (μ m)	ratio of microorganisms		number of strains isolated	
		ADT-I(%)	ADT-IV(%)	ADT-I	ADT-IV
<i>Bacillus</i> I	>1	2~5	2~6	28	14*
<i>Bacillus</i> II	0.5~1	33~41	29~46	45	18*
<i>Bacillus</i> III	<0.5	23~31	12~20	34	5*
Nocardioform bacteria	0.3~0.5	10~18	5~10	10	2*
Gram-positive rods	<0.5	12~16	15~27	17	7*
Cocci	0.8~2.0	2	2	10	4*
Gram-negative rods	<0.5	2~5	9~16	18	8*
<i>Clostridium</i> spp.	<0.5	3	1	12	1*
Yeasts		<1	<1	2	2*
number of bacteria (cfu/ml)		$6 \times 10^8 \sim 3 \times 10^9$			

ADT- I , the first aerobic digestion tank. ADT-IV, the fourth aerobic digestion tank

*, Strains isolated from ADT-IV were detected from ADT- I .

Ratio of bacteria detected from Inachuo Sanitation Center in 1991.

number of bacteria $5 \times 10^7 - 5 \times 10^{10}$ (cfu/ml)

Bacillus I : 49% ; *Bacillus* II : 49%

Table 1-4(a) The biochemical characteristics and identification of *Bacillus* I.

Strain No	Parasporal			Motility	Anaerobic			Glucose			Indole			Use of Triethylamine	Denitrication	Hydrolysis			Soy cooked		Growth time on soil	Growth (°C)	G+C %	Identification
	Spores round	gum	swollen		Catalase	Oxidase	Glucose	Indole	Use of	ole	H ₂ S	NO ₃	NH ₃			Starch	Cas	Oil	bean	meat				
1	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	3.5	41	19	+	15-45	36	<i>B.cereus</i>
2	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	0	51	29	+	15-45	35	<i>B.thuringensis</i>
3	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	0.4	40	20	+	15-45	35	<i>B.thuringensis</i>
4	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	0	36	22	+	15-45	36	<i>B.thuringensis</i>
5	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	0	70	23	+	15-45	39	<i>B.thuringensis</i>
6*	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	0	62	42	+	15-45	39	<i>B.thuringensis</i>
7*	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	0	45	27	+	15-45	37	<i>B.thuringensis</i>
8*	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	0	46	26	+	15-45	35	<i>B.thuringensis</i>
9*	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	0	46	31	+	15-45	35	<i>B.cereus</i>
10*	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	1.3	38	31	+	15-45	35	<i>B.thuringensis</i>
11*	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	0	39	222	+	15-45	42	<i>B.cereus/thuringensis</i>
12	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	0	32	32	+	15-45	36	<i>B.cereus</i>
13	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	0	40	42	+	15-45	41	<i>B.thuringensis/megaterium</i>
14*	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	0	42	31	+	15-45	37	<i>B.thuringensis</i>
15	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	0	34	63	+	15-45	35	<i>B.cereus</i>
16	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	0	49	49	-	10-45	37	<i>B.megaterium</i>
17*	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	1.8	52	27	+	15-45	36	<i>B.cereus</i>
18	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	0	41	29	+	10-45	43	<i>B.megaterium</i>
19	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	0	37	69	-	10-45	41	<i>B.megaterium</i>
20*	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	5.5	33	31	+	15-45	36	<i>B.cereus</i>
21*	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	0	49	23	+	15-45	36	<i>B.cereus</i>
22	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	0	45	27	+	10-45	34	<i>B.megaterium/cereus</i>
23	-	NE	-	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	+	-	-	-	-	-	+	0	49	138	+	NE	NE	unidentified
24	-	NE	-	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	+	+	+	+	-	-	-	0	34	240	+	NE	NE	unidentified
25*	-	NE	-	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	+	+	-	+	-	-	-	0	37	604	+	NE	NE	unidentified
26*	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	0	47	37	+	15-45	37	<i>B.cereus</i>
27*	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	0	43	44	+	15-46	37	<i>B.cereus</i>
28*	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	0	44	34	+	15-47	37	<i>B.cereus</i>

Bacillus I > $\phi 1 \mu m$. NE, not experimented.
 *, also isolated from ADT-IV

Table 1-4(b). The biochemical characteristics and identification of *Bacillus* II.

Strains No	Parasporan			Anaero			Denit Hydrolysis										Soy cooked bean meat Oil reduced	G. time on night soil	Growth (°C)	G+C %	Identif cation			
	Spores round	poral crys	gum swollen	Moti lase	Cata dase	Oxi gath	Glucose O F V-P	Ind ole	Use of H ₂ S NO ₃ NH ₃	Triethyl amine	rifica tion	Sta rch	Cas ein	mg·6ml %	min									
1*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	8	81	23	+	15-50	45	<i>B.pumilus</i>
2*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	85	33	+	10-50	43	<i>B.pumilus</i>
3*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	93	25	+	10-50	41	<i>B.pumilus</i>
4*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	93	30	+	15-50	43	<i>B.pumilus</i>
5	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	91	26	+	10-50	43	<i>B.pumilus</i>
6	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	4	88	33	+	15-50	43	<i>B.subtilis</i>
7*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	6	85	30	+	15-50	42	<i>B.pumilus</i>
8	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	9	87	35	+	15-50	42	<i>B.pumilus</i>
9	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	91	24	+	10-50	43	<i>B.pumilus</i>
10	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	2	91	30	+	10-50	43	<i>B.subtilis</i>
11*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	98	39	+	10-50	43	<i>B.subtilis</i>
12*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	1	100	43	+	10-50	43	<i>B.pumilus</i>
13	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	83	32	+	10-50	42	<i>B.pumilus</i>
14*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	5	50	49	-	15-50	46	<i>B.pumilus</i>
15	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	9	90	26	+	15-50	43	<i>B.pumilus</i>
16	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	7	33	42	-	15-50	43	<i>B.pumilus</i>
17*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	88	24	+	15-50	40	<i>B.pumilus</i>
18*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	4	79	21	+	15-50	43	<i>B.subtilis</i>
19*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	3	87	36	+	15-50	42	<i>B.pumilus</i>
20	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	7	82	33	-	15-50	46	<i>B.subtilis</i>
21	-	-	-	+	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	+	+	-	-	+	4	29	NE	+	NE	NE	unidentified
22*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	7	31	47	+	15-50	44	<i>B.pumilus</i> / <i>subtilis</i>
23	NE	NE	-	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	-	+	-	-	+	7	40	59	-	NE	NE	unidentified
24	NE	NE	-	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	-	+	-	-	+	2	32	53	+	NE	NE	unidentified
25	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	4	80	28	+	15-50	42	<i>B.subtilis</i>
26	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	81	30	+	15-45	47	<i>B.subtilis</i>
27	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	32	43	-	15-50	56	unidentified
28	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	26	42	-	15-50	41	<i>B.pumilus</i> / <i>subtilis</i>
29	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	48	62	+	15-45	56	unidentified
30	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	9	49	51	-	15-45	55	unidentified
31*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	8	31	78	-	15-45	42	<i>B.pumilus</i> / <i>subtilis</i>
32*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	4	86	29	+	15-50	41	<i>B.pumilus</i>
33	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	85	27	+	15-45	46	<i>B.subtilis</i>
34*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	2	43	97	+	15-50	45	<i>B.pumilus</i>
35	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	11	32	53	+	15-50	43	<i>B.pumilus</i> / <i>subtilis</i>
36	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	57	85	+	15-50	46	<i>B.pumilus</i>
37	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	91	24	+	15-50	43	<i>B.pumilus</i>
38	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	10	86	37	-	15-50	43	<i>B.pumilus</i>
39	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	34	31	+	15-45	46	<i>B.pumilus</i>
40*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	2	37	30	+	15-50	NE	unidentified
41*	-	-	-	+	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	+	-	+	-	-	+	0	36	191	+	NE	NE	unidentified
42*	-	-	-	+	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	+	-	+	-	-	+	7	29	47	-	NE	NE	unidentified
43	-	-	-	+	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	+	-	+	-	-	+	8	35	84	-	NE	NE	unidentified
44	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	87	21	+	15-50	44	<i>B.pumilus</i>
45	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	0	55	24	+	15-50	43	<i>B.pumilus</i>

Bacillus II > ϕ 0.5~1 μ m. NE, not experimented.
*also isolated from ADT-IV.

Table 1-4(c). The biochemical characteristics and identification of *Bacillus* III.

Strains No	Parasporan			Moti lase	Cata dase	Oxi growth	Anaero bic	Glucose			Ind ole	Use of			Triethyl amine	Denit rifica tion	Hydrolysis Sta rch	Cas ein	Soy cooked		G. time on soil	Growth (°C)	G+C %	Identifi cation	
	Spores round	poral crys	Sporan swollen					O	F	V-P		H ₂ S	NO ₃	NH ₃					Oil mg·6ml	bean reduced					meat min
1	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	5	33	100	+	15-40	56	unidentified
2*	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0	32	65	+	15-40	62	<i>B.schlegelii</i>
3	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0	34	65	+	15-40	69	<i>B.schlegelii</i>
4	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0	32	157	+	15-40	58	unidentified
5	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	0	34	NG	+	15-40	63	<i>B.schlegelii</i>
6	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	16	44	173	+	15-40	62	<i>B.schlegelii</i>
7	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0	35	87	+	15-40	63	<i>B.schlegelii</i>
8	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	32	522	+	15-40	67	<i>B.schlegelii</i>
9	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	33	111	+	15-40	65	<i>B.schlegelii</i>
10	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	8	31	NG	+	15-40	64	<i>B.schlegelii</i>
11	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1	31	405	+	15-40	55	unidentified
12	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2	NG	59	-	15-40	64	<i>B.schlegelii</i>
13	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	2	34	91	+	15-40	65	<i>B.schlegelii</i>
14	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	5	56	NG	-	15-40	65	<i>B.schlegelii</i>
15*	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	31	86	+	15-40	66	<i>B.schlegelii</i>
16	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	72	52	+	15-40	67	<i>B.schlegelii</i>
17	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1	34	85	-	15-40	67	<i>B.schlegelii</i>
18	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1	33	43	+	15-40	65	<i>B.schlegelii</i>
19*	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	11	25	137	+	15-40	65	<i>B.schlegelii</i>
20	+	-	-	+	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	+	+	+	-	-	1	29	306	+	NE	NE	unidentified
21	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0	31	106	+	15-40	62	<i>B.schlegelii</i>
22	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1	NG	472	+	15-40	56	unidentified
23	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	30	152	+	15-40	68	<i>B.schlegelii</i>
24	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	0	39	NG	+	15-40	65	<i>B.schlegelii</i>
25	+	-	-	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	+	-	-	-	-	+	0	31	416	+	NE	NE	unidentified
26	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	2	30	284	+	15-40	66	<i>B.schlegelii</i>
27*	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1	27	172	+	15-40	65	<i>B.schlegelii</i>
28	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	0	31	NG	+	15-40	68	<i>B.schlegelii</i>
29	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	31	184	+	15-40	69	<i>B.schlegelii</i>
30	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0	29	418	-	15-40	67	<i>B.schlegelii</i>
31	+	-	-	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	+	-	-	-	+	6	29	498	-	NE	NE	unidentified
32	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	3	31	105	+	15-40	67	<i>B.schlegelii</i>
33	+	-	-	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	+	+	+	-	-	3	30	504	+	NE	NE	unidentified
34*	+	-	-	+	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	+	-	-	-	-	0	33	NG	+	NE	NE	unidentified

Bacillus III < $\phi 0.5 \mu m$. NE, not experimented.

Table 1-5. The biochemical characteristics and identification of Nocardioform bacteria and Cocci

Strains No	Spore like	Gram granules	Motility	Glucose		Use of			triethyl amine	denit rification	Hydrolysis of		Soy bean	Cooked meat reduced time	G. on night soil	growth	G+C (%)	Identification			
				O	F	H ₂ S	NO ₃	NH ₃			Starch	Casein							Oil		
Nocardioform bacteria													mg·6ml	%	min						
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NG	32	NG	-	NE	unidentified			
2	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	6	29	637	+	71	<i>O.turbata</i>			
3	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	2	35	218	+	NE	unidentified			
4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	1	32	229	+	68	<i>O.turbata</i>			
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	7	35	130	+	68	<i>O.turbata</i>			
6	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	4	23	328	+	69	<i>O.turbata</i>			
7	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	4	37	394	+	72	<i>O.turbata</i>			
8	*	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	19	42	186	+	70	<i>O.turbata</i>			
9	*	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	0	55	170	+	69	<i>O.turbata</i>			
10	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	9	28	203	+	73	<i>O.turbata</i>			
Cocci																					
1	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	1	NG	167	+	46	<i>Planococcus</i> sp.			
2	*	+	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-	+	0	NG	NE	-	NE	unidentified			
3	*	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	6	40	NE	+	69	<i>Deinococcus</i> sp.			
4	+	-	-	NE	NE	-	-	-	+	-	-	+	0	32	46	-	NE	unidentified			
5	*	+	-	NE	NE	+	-	-	-	-	-	-	1	37	51	-	NE	unidentified			
6	+	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-	-	1	32	35	-	NE	unidentified			
7	+	-	-	NE	NE	-	-	+	-	-	-	-	11	34	134	+	NE	unidentified			
8	*	+	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-	-	0	32	32	-	NE	unidentified			
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	13	31	NE	-	NE	<i>Gemella</i> sp.			
10	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	0	33	252	+	67	<i>Deinococcus</i> sp.			

NE, not experimented. *also isolated from ADT-IV.

Table 1-6. Biochemical characteristics of gram-negative rods, *Clostridium* sp. and Yeasts isolated in 1994.

strains	No	Spore	Shape	Size	Motility	Flagella	Catalase	Use of				Denit tion	Hydrolysis		soy bean Oil	cooked meat reduced	Growth G—on night time soil
								H ₂ S	NO ₃	NH ₃	amine		Sta	Cas			
Gram-positive rod: (μ m)																	
1	—	R/F	0.2x1	+	Pe	+	—	+	—	—	+	—	—	0	36	NG	+
2	—	R/F	0.3x2.5	+	Pe	+	+	+	—	—	+	—	—	3	NG	157	—
3	—	R/F	0.3x2.5	+	Pe	+	—	+	—	—	—	—	—	4	33	100	+
4	—	R/F	0.3x2.5	+	Pe	+	—	+	—	+	+	—	—	2	35	76	+
5	—	R/F	0.2x2.0	+	Pe	+	+	—	—	—	—	—	+	0	31	299	+
6	—	R/F	0.3x2.0	+	Pe	+	+	—	—	—	—	—	—	0	32	NG	+
7*	—	R/F	0.3x2.5	+	Pe	+	—	+	—	—	—	—	+	10	40	NG	+
8*	—	R/F	0.2x3.0	+	Pe	+	—	—	—	—	—	—	—	2	NG	NG	—
9	—	R/F	0.2x3.0	+	Pe	+	+	+	—	—	—	—	+	0	35	NG	—
10*	—	R/F	0.3x3.0	+	Pe	+	—	+	—	—	—	—	—	0	NG	NG	—
11	—	R/F	0.3x2.5	+	Pe	+	+	—	+	+	—	—	+	1	31	NG	+
12*	—	R/F	0.3x2.0	+	Pe	+	—	+	—	—	—	—	+	8	58	478	+
13*	—	R/F	0.3x2.5	+	Pe	+	—	+	—	—	—	—	+	3	31	56	+
14*	—	R/F	0.2x2.0	+	Pe	+	—	+	—	+	+	—	—	4	32	NG	+
15	—	R/F	0.3x2.0	+	Pe	+	—	+	—	—	+	—	—	5	30	75	+
16*	—	R/F	0.3x2.0	+	Pe	+	—	+	—	—	+	—	+	1	31	74	+
17	—	R/F	0.3x3.0	+	Pe	+	—	+	—	—	—	—	+	0	74	NG	+
Gram-negative rods																	
1*	—	R	0.3x2.5	+	NE	—	—	NG	—	—	NG	—	—	NG	31	NE	—
2*	—	R	0.5x2.5	+	NE	+	+	+	—	—	—	—	—	0	36	85	+
3*	—	R	0.3x2	+	NE	+	—	+	—	—	—	—	—	0	32	195	+
4	—	R	0.2x1.5	+	NE	+	—	NG	—	—	NG	—	—	NG	38	NE	+
5	—	R	0.5x3	+	NE	+	+	NG	—	—	NG	—	—	2	34	NE	+
6	—	R	0.8x2	+	NE	—	+	NG	—	—	NG	—	—	0	33	164	+
7	—	R	0.3x2.5	+	NE	+	—	NG	—	+	NG	—	—	0	34	126	+
8	—	R	0.2x1.5	+	NE	+	—	NG	—	+	NG	—	—	5	34	284	+
9	—	R	0.3x2	+	NE	+	—	+	—	+	+	—	—	NG	30	101	+
10*	—	R	0.5x4	+	NE	+	—	+	—	+	—	—	—	2	29	59	+
11	—	R	0.2x1.5	+	NE	+	—	NG	—	+	NG	—	—	1	32	154	+
12	—	R	0.3x2.5	+	NE	+	—	NG	—	+	NG	+	+	NG	44	NE	+
13*	—	R	0.3x1.5	+	NE	+	+	—	—	+	—	+	+	2	33	NE	+
14*	—	R	0.5x3	+	NE	+	—	+	—	—	—	+	+	0	47	NE	+
15	—	R	0.3x2	+	NE	+	—	NG	—	—	NG	—	+	0	29	NE	+
16*	—	R	0.5x2.5	+	NE	—	—	+	+	+	—	—	—	0	33	NE	+
17*	—	R	0.3x2	+	NE	+	+	NG	—	+	NG	—	—	0	33	315	+
18	—	R	0.2x2	+	NE	—	+	NG	+	+	NG	—	+	0	34	90	+
<i>Clostridium</i> sp.																	
1	+	R	0.3x1.5	—	NE	+	—	NE	—	—	NE	—	+	NE	32	NE	—
2*	+	R	0.3x1.5	—	NE	+	—	NE	—	—	NE	—	—	NE	31	NE	—
3	+	R	0.3x1.5	—	NE	+	—	NE	—	—	NE	—	+	NE	33	NE	—
4	+	R	0.3x1.5	—	NE	+	+	NE	—	—	NE	—	+	0	34	NE	—
5	+	R	0.3x1.5	—	NE	+	—	NE	—	—	NE	—	—	0	31	NE	—
6	+	R	0.3x1.5	—	NE	—	—	NE	—	—	NE	—	—	NE	33	NE	—
7	+	R	0.3x1.5	—	NE	—	—	NE	—	—	NE	—	—	NE	31	NE	—
8	+	R	0.3x1.5	—	NE	+	+	NE	+	+	NE	—	+	1	31	NE	—
9	+	R	0.2x1.5	—	NE	—	—	NE	+	—	NE	—	—	0	33	NE	—
10	+	R/F	0.3x1.5	—	NE	+	+	—	—	+	—	—	—	0	32	NG	+
11	+	R	0.3x1.5	—	NE	+	+	—	—	—	—	—	+	1	32	NG	—
Yeasts ¹⁾																	
1	—	C	3-5	—	NE	NE	+	NE	+	+	NE	+	+	3	82	NE	+
2	—	C	3-5	—	NE	NE	+	NE	+	—	NE	+	—	0	88	NE	—

*. also isolated from ADT-IV.

1) contaminated by unidentified *Bacillus* III.

Table 1-7(a). The comparison of the solubilizable ability of starch, protein and fat of bacteria isolated in 1991 with those in 1994.

Substrate	Strains with Solubilizable ability	Ratio the number of bacteria(%)		
		1991	1994	
Starch	Bacillus sp.			
	<i>B.thuringiensis</i>	39	<1	
	<i>B.megaterium</i>	3	0	
	<i>B.cereus</i>	—	<1	
	<i>B.subtilis</i>	3	7	
	<i>B.schlegeli</i>	—	<1	
	unidentified	0	3	
	Oerskovia sp.			
	<i>O.turbata</i>	3	11	
	unidentified	0	2	
	Gram-positive bacteria	—	<1	
	Gram-nositive bacteria	0	<1	
	Cooked meat	Bacillus sp.		
		<i>B.thuringiensis</i>	4	<1
<i>B.megaterium</i>		0	<1	
<i>B.cereus</i>		—	<1	
<i>B.subtilis</i>		3	7	
<i>B.pumilus</i>		41	19	
<i>B.schlegeli</i>		—	1	
unidentified		6	0	
Oerskovia sp.				
<i>O.turbata</i>		0	1	
Gram-positive bacteria		—	2	
Soybean oil		Bacillus sp.		
		<i>B.thuringiensis</i>	32	<1
		<i>B.megaterium</i>	3	0
	<i>B.cereus</i>	—	<1	
	<i>B.subtilis</i>	3	4	
	<i>B.pumilus</i>	25	12	
	<i>B.schlegeli</i>	—	12	
	unidentified	6	11	
	Oerskovia sp.			
	<i>O.turbata</i>	0	9	
	unidentified	0	2	
	<i>Planococcus sp.</i>	—	<1	
	<i>Deinococcus sp.</i>	—	<1	
	Gram-positive bacteria	—	9	
Gram-negative bacteria	3	2		

—, did not detected

Table 1-7(b). The comparison of the solubilizable ability malodor and denitrification of bacteria isolated in 1991 with those in 1994

Substrate	Strains with Solubilizable ability	Ratio the number of bacteria(%)	
		1991	1994
Malodor (H ₂ S&EtN)	Bacillus sp.		
	<i>B.thuringiensis</i>	34	<1
	<i>B.megaterium</i>	3	<1
	<i>B.cereus</i>	—	<1
	<i>B.subtilis</i>	3	8
	<i>B.pumilus</i>	46	19
	<i>B.schlegeli</i>	—	5
	unidentified	6	4
	Oerskovia sp.		
	<i>O.turbata</i>	3	6
	unidentified	0	2
	Gram-positive bacteria	—	4
	Gram-negative bacteria	0	3
	NH ₃	Bacillus sp.	
<i>B.thuringiensis</i>		31	<1
<i>B.megaterium</i>		3	<1
<i>B.cereus</i>		—	<1
<i>B.subtilis</i>		3	7
<i>B.pumilus</i>		6	12
<i>B.schlegeli</i>		—	1
unidentified		3	5
Oerskovia sp.			
<i>O.turbata</i>		3	8
unidentified		0	2
Gram-positive bacteria		—	2
Gram-negative bacteria		3	1
Denitrifi cation		Bacillus sp.	
	<i>B.thuringiensis</i>	3	—
	<i>B.subtilis</i>	3	—
	<i>B.pumilus</i>	43	<1
	<i>B.schlegeli</i>	—	7
	unidentified	6	2
	Gram-positive bacteria	—	7
Gram-negative bacteria	3	1	

—, did not detected

Table 1-8. The effects of inorganic ions on the growth of *Bacillus* sp. and *Oerskovia* sp.

Strains	Generation time			OD of stationary phase			Filament			
	No	Control	Mg ²⁺	Mg ²⁺ + Si	Control	Mg ²⁺	Mg ²⁺ + Si	Control	Mg ²⁺	Mg ²⁺ + Si
<i>Bacillus</i> I										
1	21 (5.0)	29 (5.0)	29 (5.0)	1.04	0.96	0.99	—	—	—	—
2	22 (5.5)	24 (5.5)	25 (5.0)	1.02	1.01	1.00	—	—	—	—
3	25 (5.5)	29 (5.5)	28 (5.5)	1.02	0.89	0.89	—	—	—	—
13	26 (6.5)	33 (5.0)	41 (6.0)	1.00	0.94	0.82	—	—	—	—
<i>Bacillus</i> II										
1	29 (2.5)	36 (4.0)	38 (3.5)	1.00	1.21	1.15	+	—	—	—
2	33 (2.0)	31 (4.5)	33 (4.5)	1.00	1.14	1.08	+	—	—	—
6	33 (2.5)	30 (5.5)	33 (5.5)	1.05	1.28	1.21	+	—	—	—
10	30 (2.5)	30 (6.5)	31 (6.5)	1.00	1.27	1.28	+	—	—	—
11	39 (4.5)	37 (5.5)	40 (5.5)	1.03	1.05	1.10	+	—	—	—
18	21 (1.5)	21 (4.5)	24 (4.0)	1.01	1.27	1.25	+	—	—	—
20	33 (3.0)	30 (3.0)	31 (4.0)	1.00	1.03	1.10	+	—	—	—
25	28 (2.5)	30 (4.0)	33 (3.5)	1.07	1.21	1.17	+	—	—	—
26	30 (4.0)	31 (5.0)	34 (5.0)	1.06	1.13	1.17	+	—	—	—
<i>Oerskovia</i> spp										
2	ND	ND	ND	1.01	1.11	1.30	—	—	—	—
8	ND	ND	ND	1.01	1.32	1.32	—	—	—	—

(), period (hr) of exponential phase

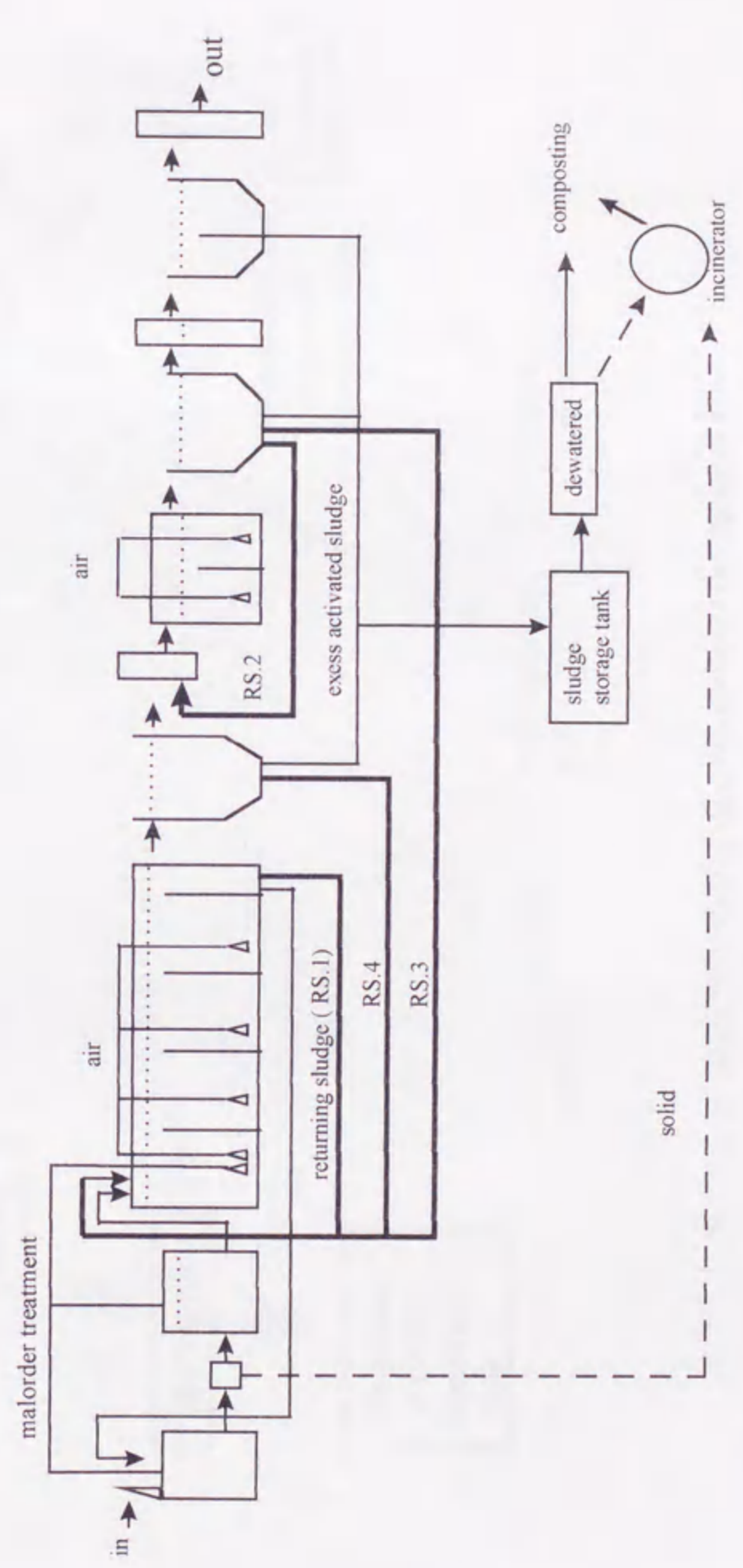
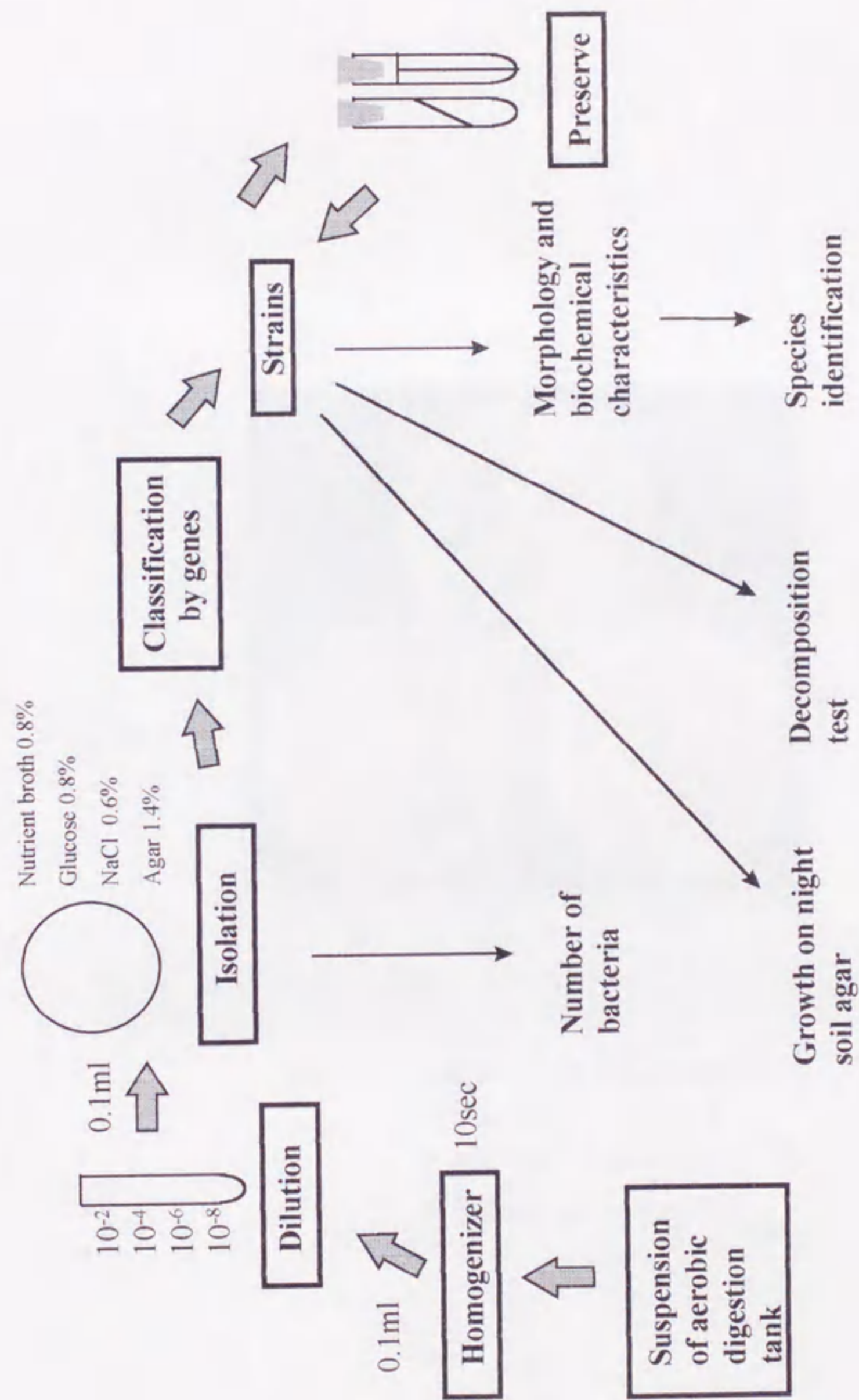


Fig.1 Aerobic night soil treatment process at Inachuo Sanitation center(200K//day).



Fi. 1-2 Isolation procedure of microorganisms from suspension of aerobic digestion tank



Fig. 1-3. Removal ratio of cooked meat.
A: Insoluble ($\leq 46\%$)
B: Soluble ($\geq 46\%$)
C: Soluble more than 80%

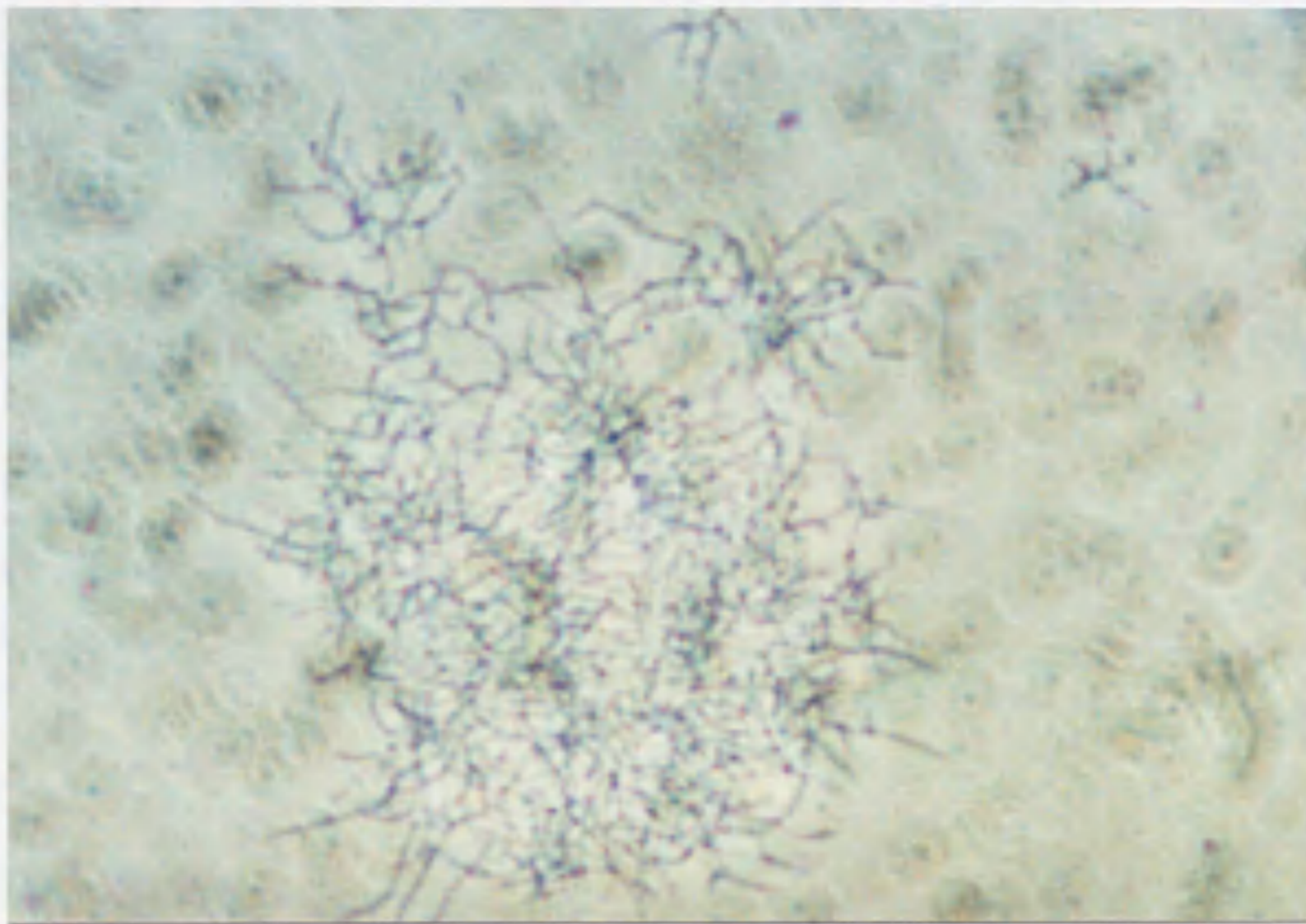


Fig .1-4. The morphological shape of Nocardioform
bacteria (strain No:8) (×600).

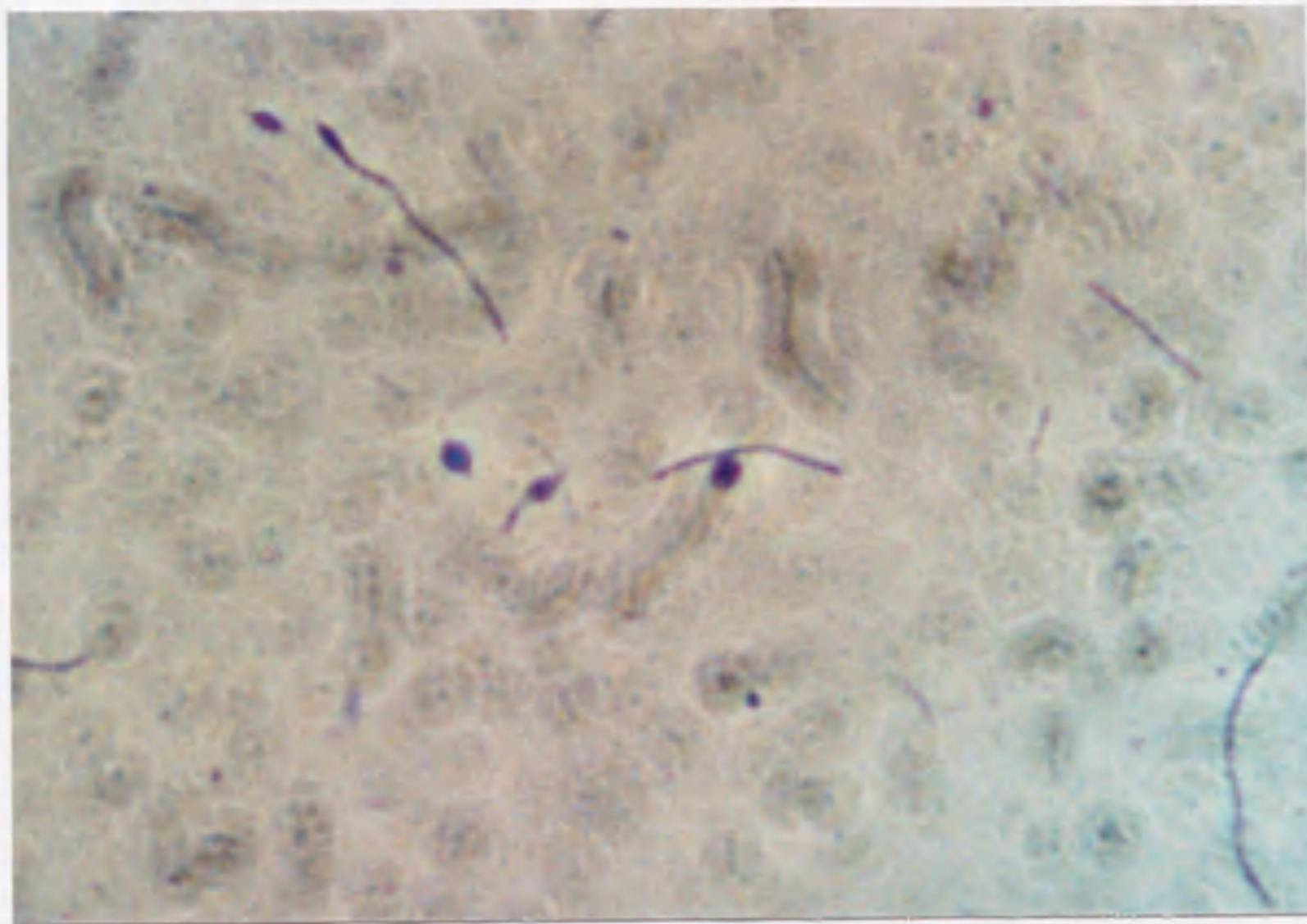


Fig.1-5. The spores of *Clostridium* sp. (×400).

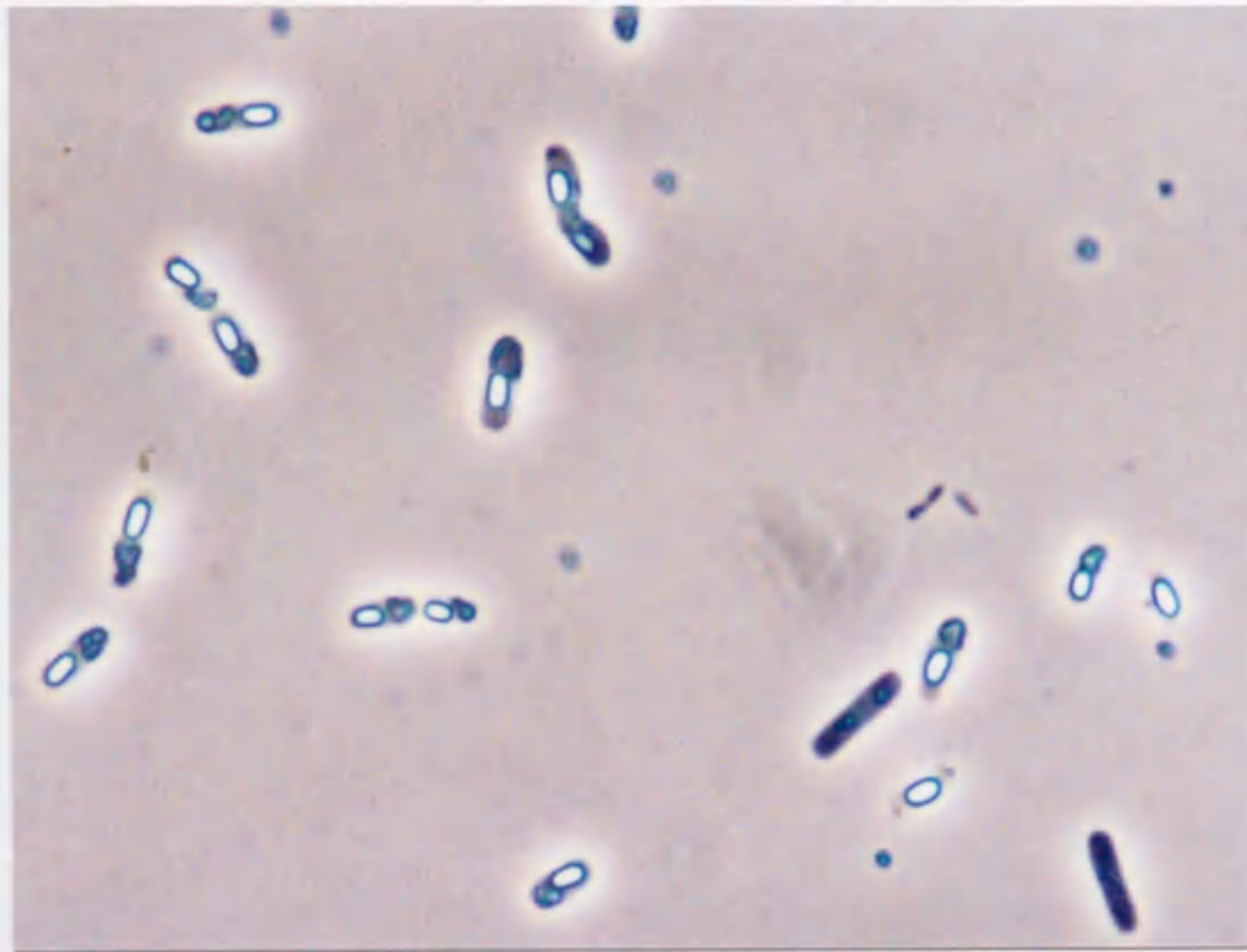


Fig.1-6. The parasporal crystals formation of *Bacillus I* strain No:5 (*B.thuringiensis*) ($\times 1200$).

No. 004

JEDL

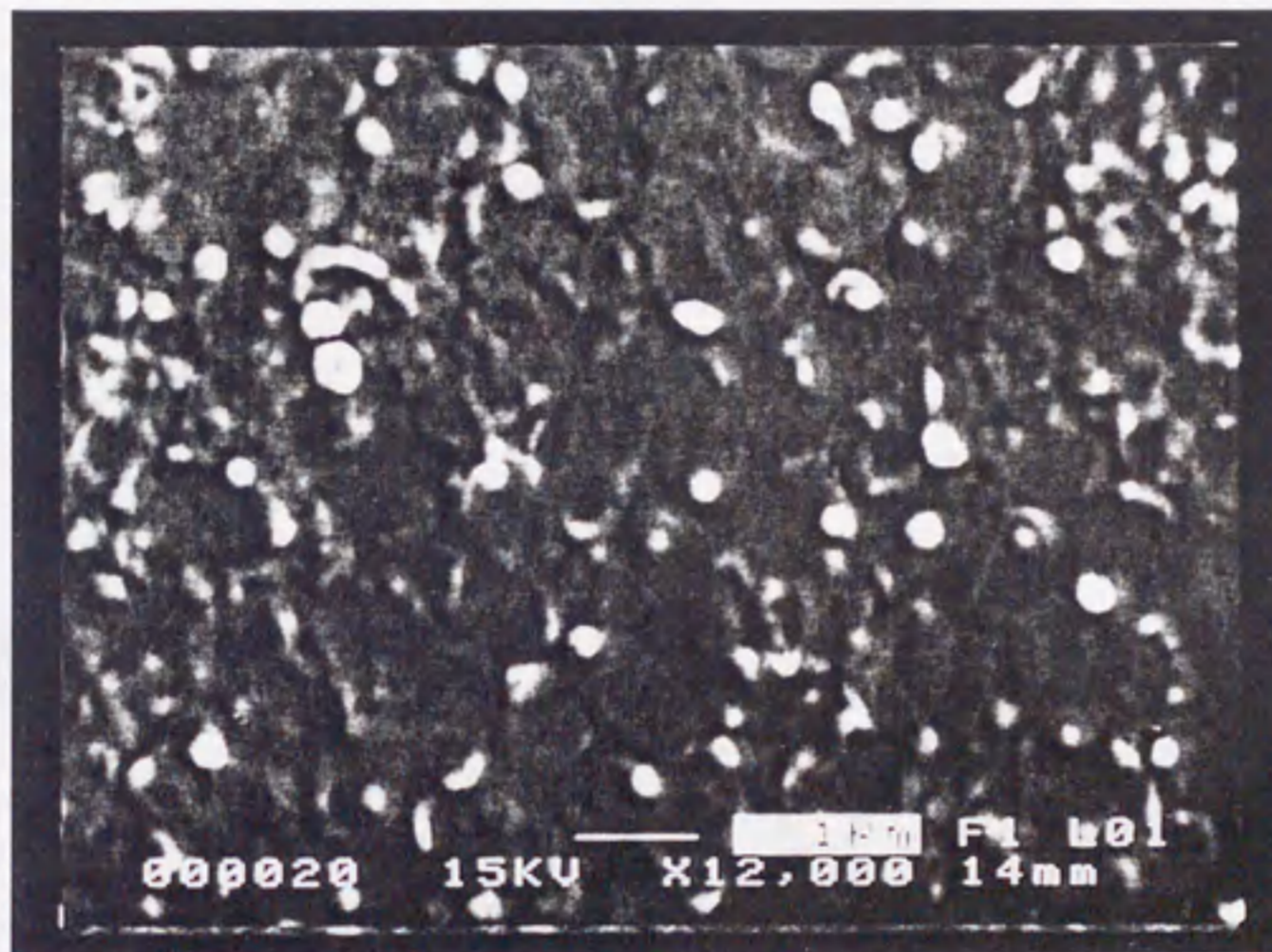
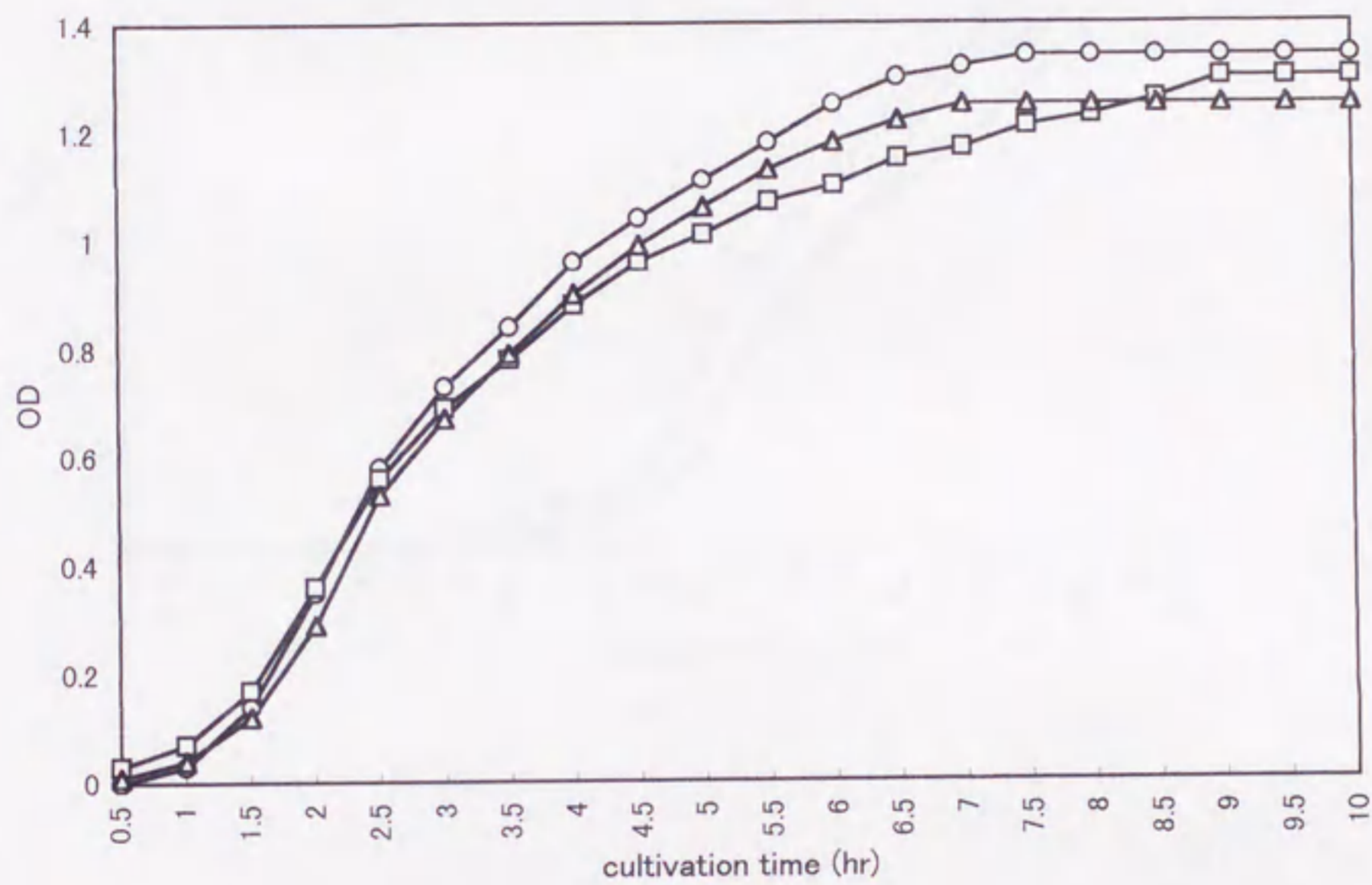
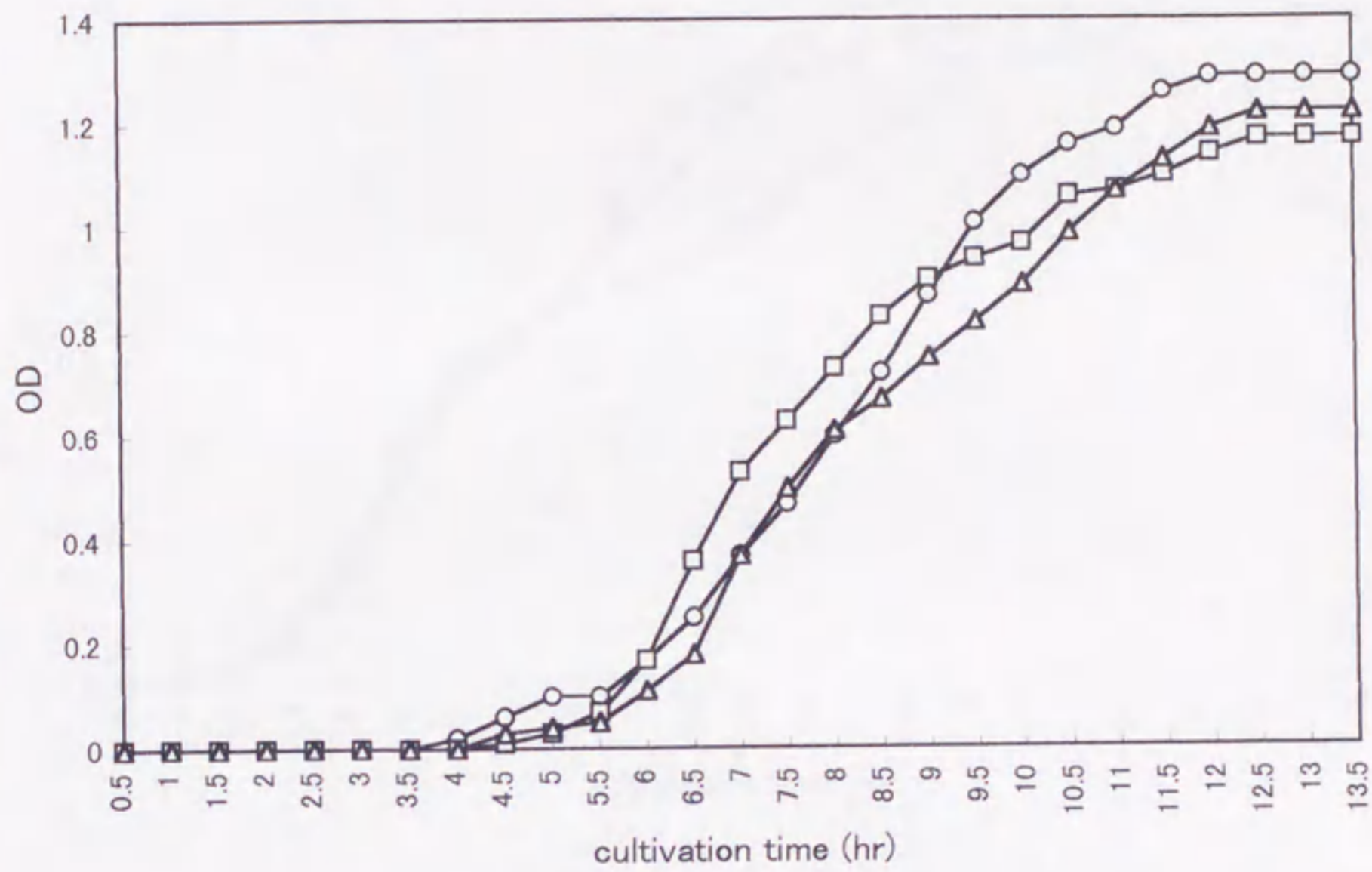


Fig.1-7. Electron Micrograph of the spores of *B.schleglii* .



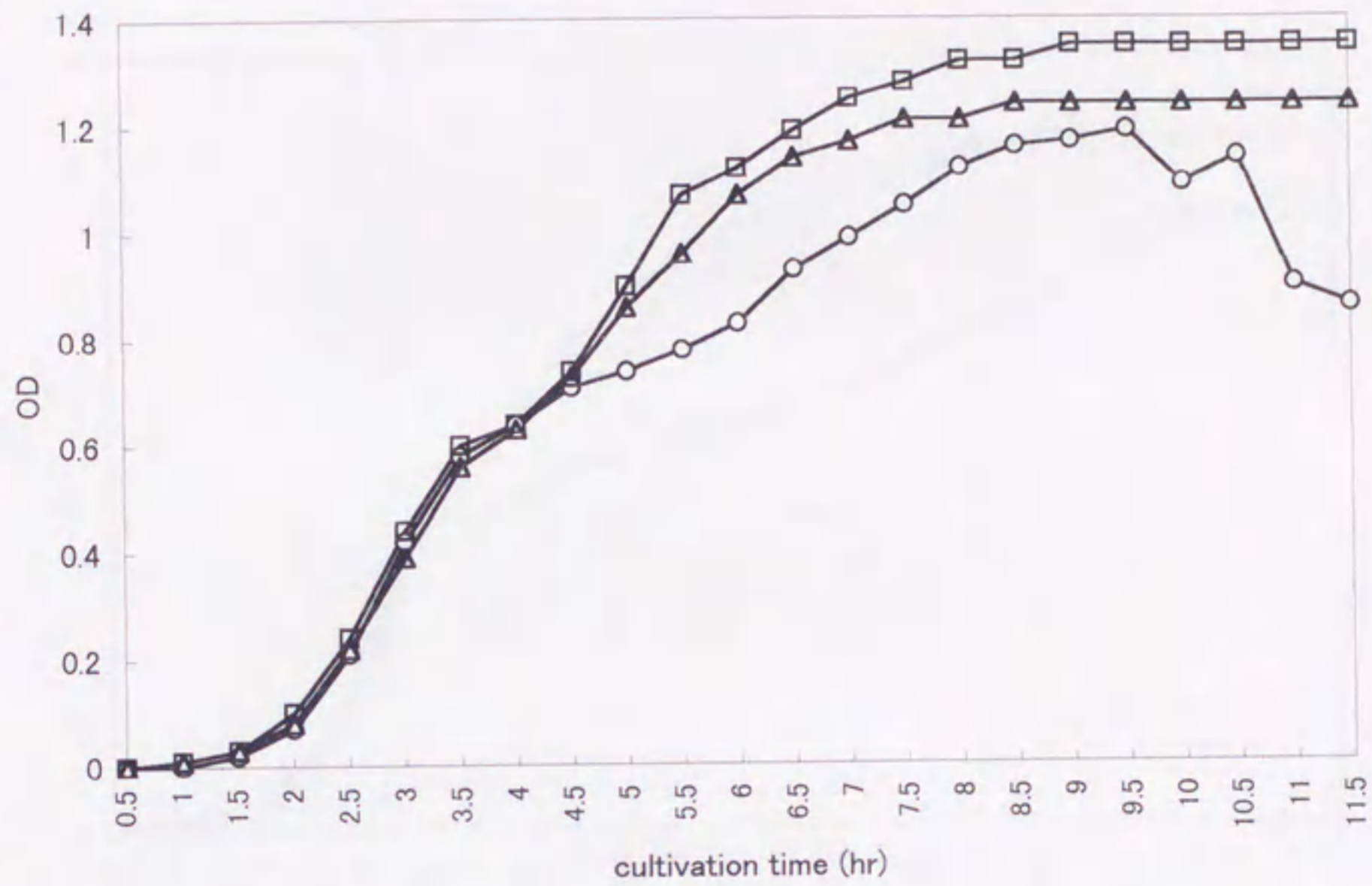
○, Control
 □, Mg²⁺ (5mg/l)
 △, Mg²⁺ (5mg/l) + Si(10mg/l)

Fig.1-8. (a)The growth curves of *Bacillus* I (strain 1) by addition of Mg Ion and Silicic acid.



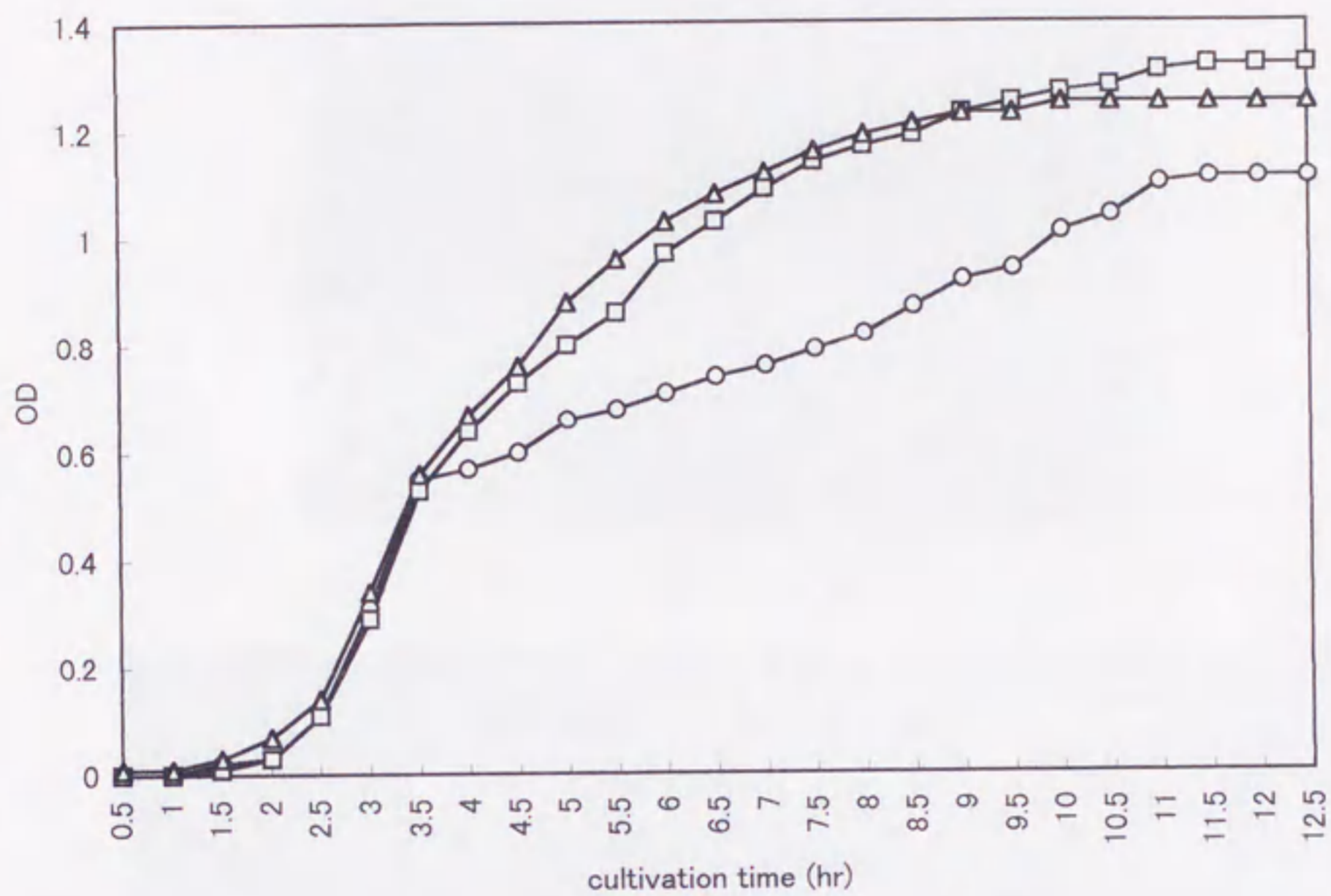
○, Control
 □, Mg²⁺ (5mg/l)
 △, Mg²⁺ (5mg/l) + Si(10mg/l)

Fig.1-8 (b). The growth curves of *Bacillus I* (strain 13) by addition of Mg Ion and Silicic acid.



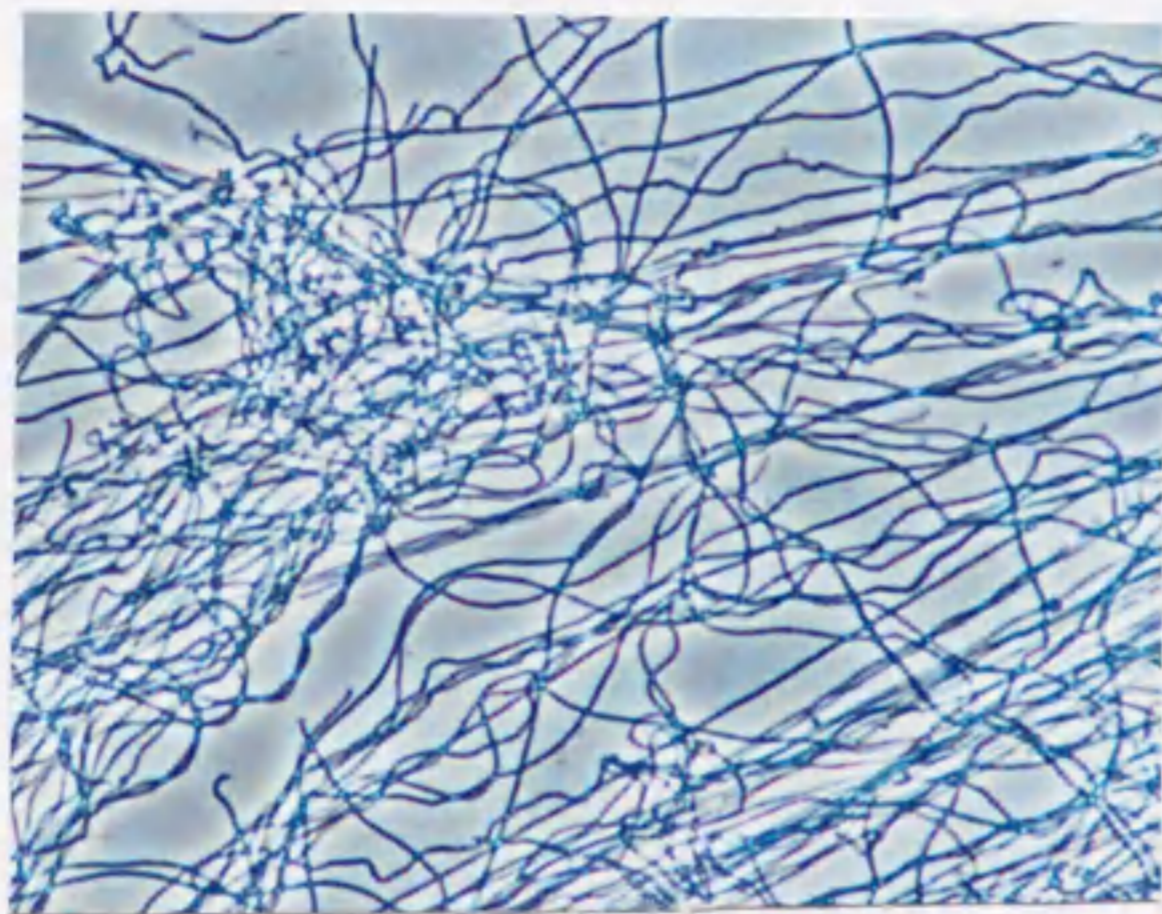
○, Control
 □, Mg²⁺ (5mg/l)
 △, Mg²⁺ (5mg/l) + Si(10mg/l)

Fig.1-9 (a). The growth curves of *Bacillus* II (strain6) by addition of Mg Ion and Silicic acid.

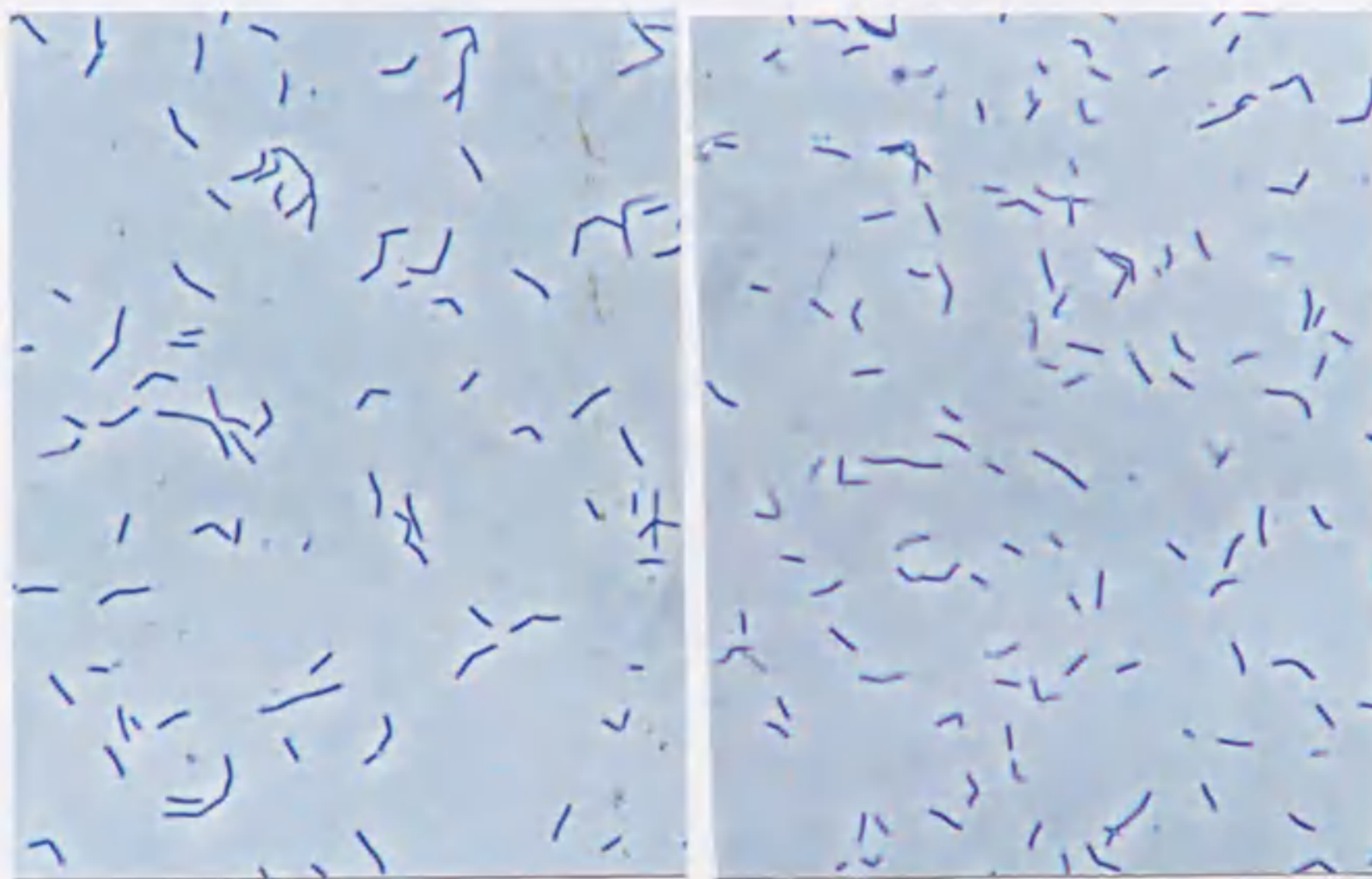


○, Control
 □, Mg²⁺ (5mg/l)
 △, Mg²⁺ (5mg/l) + Si(10mg/l)

Fig .1-9 (b). The growth curves of *Bacillus* II (strain 18) by addition of Mg Ion and Silicic acid.



A



B

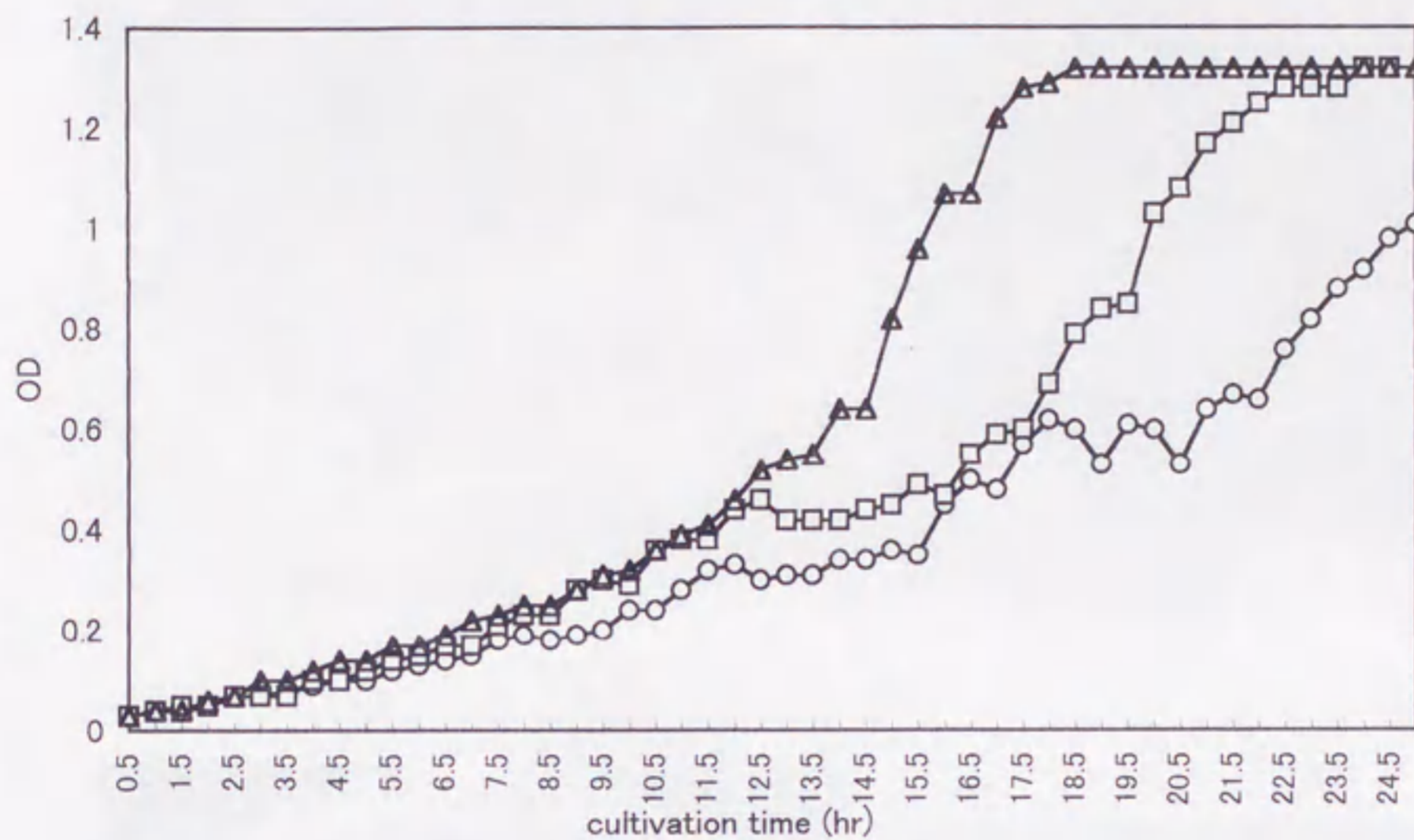
C

Fig.1-10. The morphological change of *Bacillus* II (strain 20) after 8 hours culture at 32°C.

A : without addition of Mg ion and silicic acid

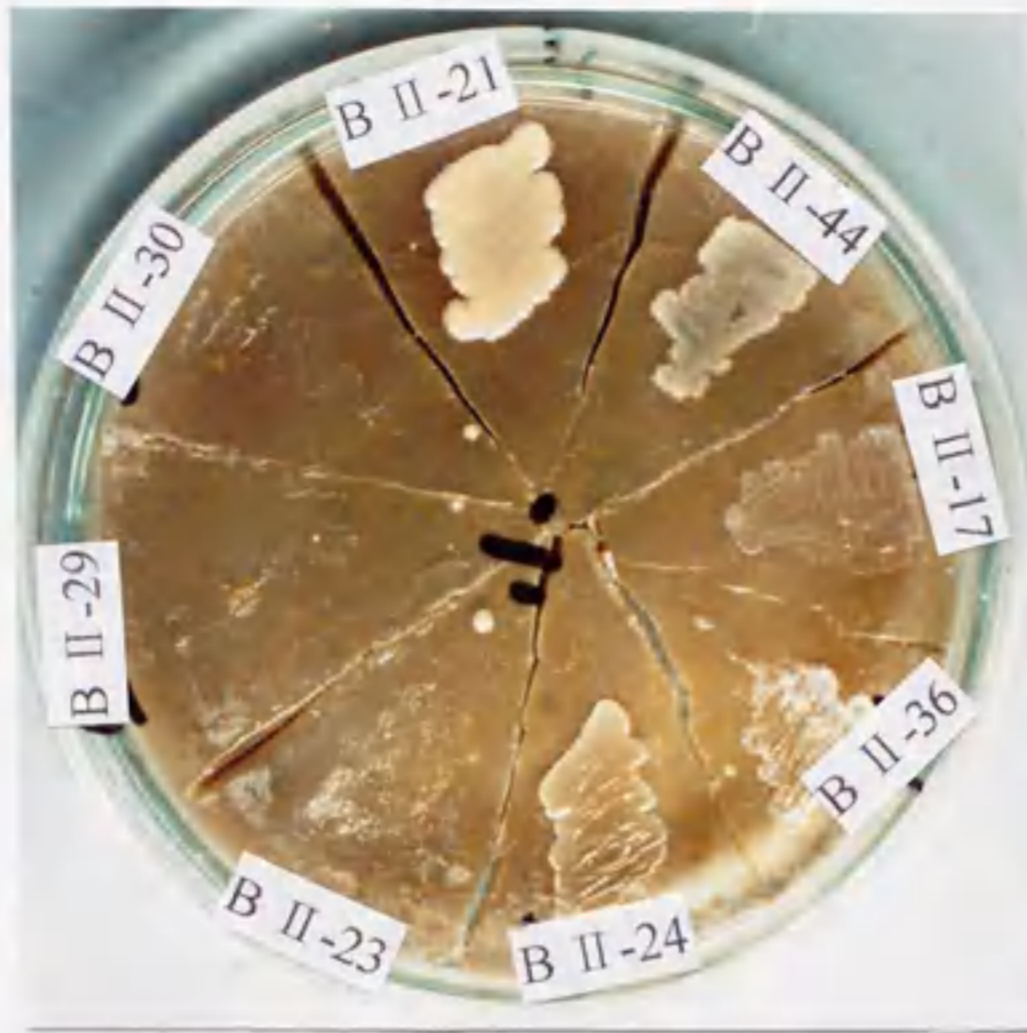
B: in the presence of Mg²⁺ (5mg/l)

C: in the presence of Mg²⁺ (5mg/l) and Si(10mg/l)



○, Control
 □, Mg²⁺ (5mg/l)
 △, Mg²⁺ (5mg/l) + Si(10mg/l)

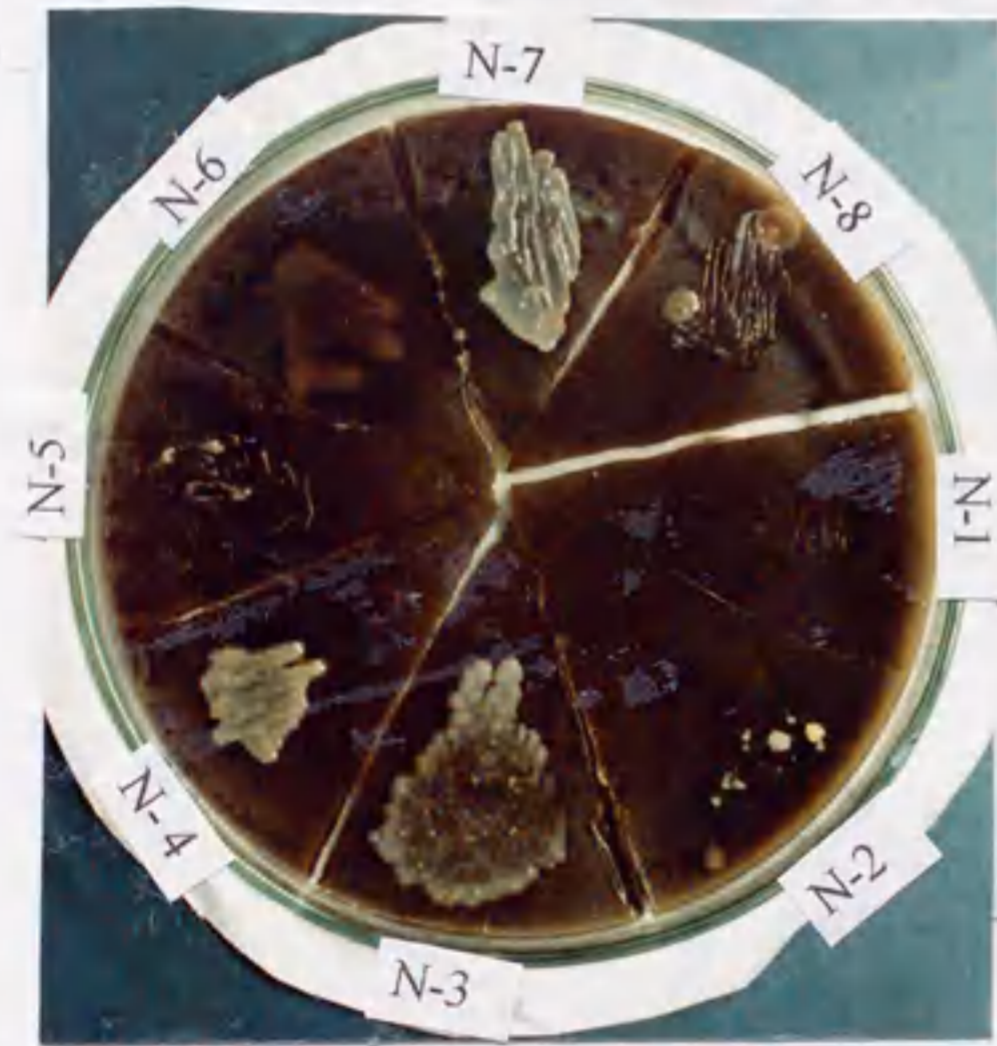
Fig .1-11. The growth curves of *Oerskovia sp.*(strain 8) by addition of Mg Ion and Silicic acid.



Pure culture



Pure culture



Pure culture



Mixing culture

Fig .1-12. Growth of bacteria on Night soil containing agar .

B II ; *Bacillus* II

B III ; *Bacillus* III

N ; Nocardioform bacteria

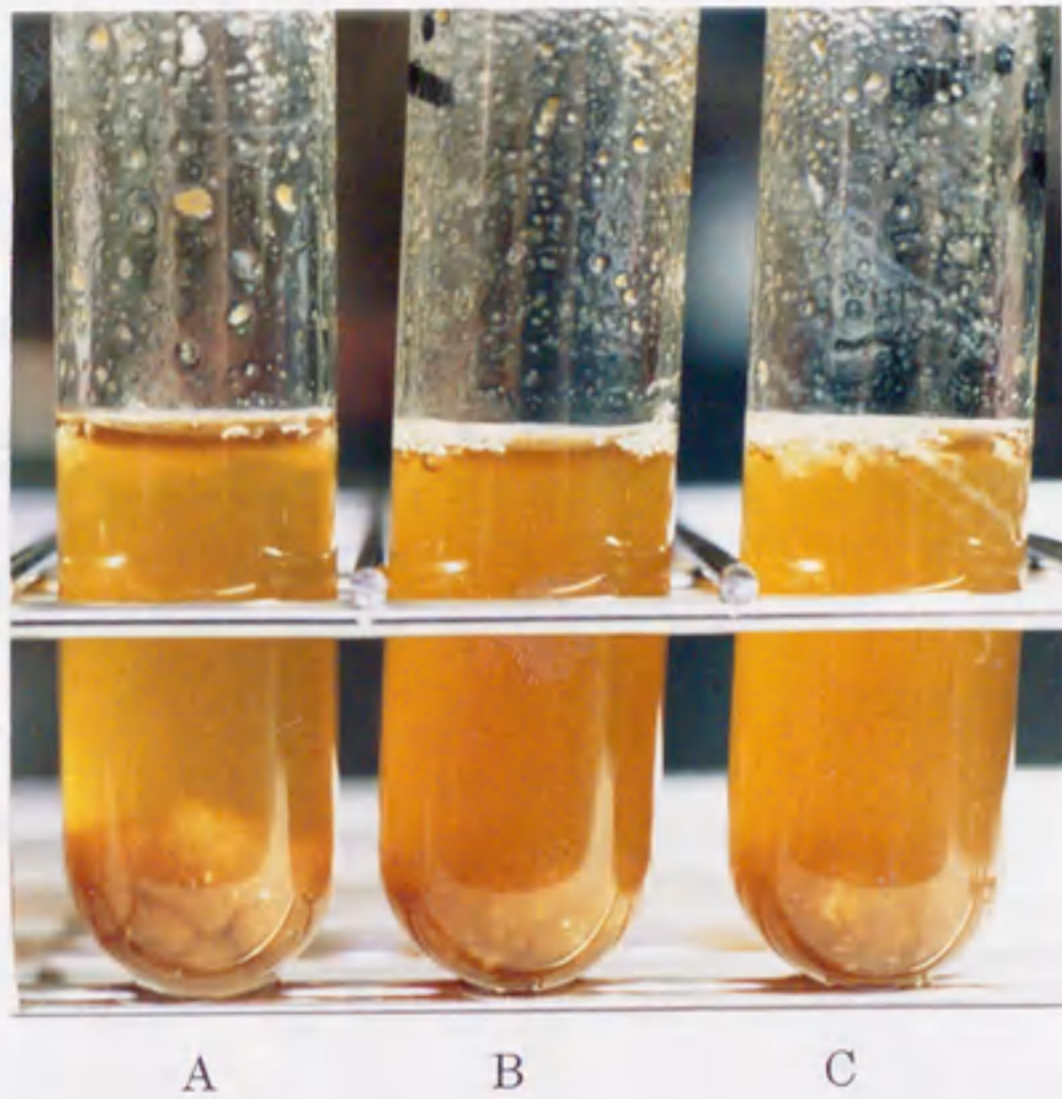


Fig.1-13. Solubilizing ability of cooked meat by *Bacillus* sp. after 5 days incubation at 32°C .
A: ICSC No:2 (1991); B: Bacillus II (No:2) ;
C: Bacillus II (No:3)

第2章 各種し尿施設における細菌相と処理状況との関連性

2.1 緒言

第1章で好気性で効率的且つ無臭処理状態を保っている伊那市伊那中央衛生センターのし尿処理処理槽から、1994年に優占する細菌を単離し、*Bacillus sp.*および*Oerskovia turbata*によって構成される細菌相が処理に主要な役割を有していることを明らかにした³⁴⁾³⁵⁾。同時に適切な曝気量、返送量の維持および水処理促進剤として Mg^{2+} やSiを添加することが必要であることを再確認した。一般にし尿処理施設は生物処理工程の維持管理が難しく、悪臭の発生の防止、処理水BODの変動の抑制や汚泥生成量の制御等が困難であり、放流水が基準値を満たすための高度処理や汚泥処理に高い経費を要する場合が知られている。現在いくつかの処理方式が運用されているが、生物処理工程における優占細菌相を比較した例は知られていない。

本研究は、し尿処理施設4ヶ所の処理状態を汚泥生成量を目安として比較する一方、優占細菌を単離し、澱粉・ククト[®]ミート・油脂分解性に関わる細菌数の割合を明らかにした。次に優占細菌相の基質資化性と汚泥生成率との関係について考察した。その結果について伊那中央衛生センターにおける処理状況と比較した。また、ククト[®]ミート分解性の*Bacillus sp.*数株について、種を同定した。

2. 2 処理方式と処理状況

本研究において優占細菌を単離したし尿施設は4ヶ所で、それぞれA、B、CおよびD施設と称する。各施設の概要はFig.2-1a、Fig.2-1bおよびFig.2-1cに示した。処理方式、処理量、滞留時間、汚泥生成率および各種分析値はTable 2-1に示した。なお、本論では汚泥生成率をし尿と浄化槽汚泥投入量に対する脱水汚泥量の割合と定義する。各分析値は生物処理工程出口における処理水の値を示した。伊那中央衛生センターの処理方法は第1章で示した。

2. 2. 1 A施設

A施設(Fig 2-1a)は強制酸化方式(80K//day)である。まずし尿を希釈し、嫌気処理後、第1攪拌槽で90%酸素気流中攪拌を行ない、第1曝気槽で空気による曝気を行っている。次いで槽内水を再度90%酸素気流中で攪拌後、第2曝気槽で曝気を行い、沈殿槽で汚泥を沈殿させる。攪拌槽および曝気槽への汚泥返送量はそれぞれ0.5Qである。好気性消化槽のMLSSは7000~8000Kg//lであったが、消化槽の容量が不明でBOD負荷が算出できなかった。

2. 2. 2 B施設

B施設(20K//day)(Fig2-1b)は強制脱窒方式と呼ばれ、し尿は嫌気状態で脱窒処理を受けた後、曝気による好気性処理を受け、再度嫌気処理(メタノール添加による脱窒処理)を受ける方式である。

曝気槽の MLSS は約 15000Kg/l、BOD 容積負荷は 1.12Kg/m³/day、BODMLSS 負荷は 0.74Kg/KgMLSS/day で操作している。この施設では曝気に特殊な装置を用いて効率化を計り、汚泥返送が 9.3Q と最も多かった。

2. 2. 3 C 施設

C 施設 (10Kl/day) (Fig2-1b) は B 施設と同一方式であるが、1991 年伊那中央衛生センターの汚泥を投入して処理の改善を図り、第 2 脱窒槽 (メタノール処理槽) を曝気槽として使用している。曝気槽の MLSS は約 12000~15000Kg/l、BOD 容積負荷は 1.84Kg/m³/day、BODMLSS 負荷は 0.15Kg/KgMLSS/day で操作している。

2. 2. 4 D 施設

D 施設は SBR 方式 (Single Batch Reactor) (100Kl/day) (Fig 2-1c) で、嫌氣的脱窒処理と好気処理を行っている。嫌気性処理の際し尿と返送汚泥を反応槽の下方から注入し、好気性処理の際槽内水を上方より落下させて空気との接触を計っている。返送 2Q、嫌気性処理 30 分、好気性処理 2 時間で運転を行っている。滞留時間は合計 2.5 時間である。この滞留時間で後に述べるように効率的な処理を行い、*Bacillus* sp. は SBR 出口の処理水中では胞子を形成している。処理槽の MLSS は 7000~8000Kg/l であったが、処理槽の容量が不明で BOD 負荷が算出できなかった。

2. 2. 5 各施設の処理状況

A～D施設では処理に季節変動が見られたが、汚泥を採取した時点ではB施設でわずかに感じる以外特に悪臭は感じなかった。

各施設の処理状態は Table2-1 に示した。伊那中央衛生センターにおける汚泥生成率は 3.3%であり、最も処理が進んでいるものと考えられる。

A施設における汚泥生成率は滞留時間が最も長いにもかかわらず 90%と最も高かった。第1曝気槽と第4曝気槽の槽内水に *Beggiatoa* sp. が数多く見られ、酸素不足であると考えられ、し尿SS成分の分解性が最も低いと考えられる。

B施設では汚泥生成率は 39% (含水率 89.1% ; 含水率 80%として 23%) であり、A施設に次いで高かった。

C施設における汚泥生成率の概算値は 7.8% であり、最高 20% 近くまで増加する。

D施設における汚泥生成率は 5.7% であり、滞留時間が短いにもかかわらず汚泥生成率は低かった。この槽内水ではフロックが存在せず細菌類が直接観察可能である (Fig.2-2)。

伊那中央衛生センターの消化槽出口処理水の T-N 値、T-P 値を A施設と比較すると高いが、A施設では処理前にし尿を希釈していることおよび汚泥生成量が伊那中央衛生センターの約 27 倍であることから、汚泥によっても希釈されていると考えられる。また、伊那中央衛生センターの処理状態を D施設と比較すると、T-N 値は D施設の汚泥生成量を考慮しても D施設より高い値であるが、T-P 値は低い。伊那中央衛生センターでは好気性消化処理後上澄水を再曝

気後浮上分離しているが、この処理で T-N は約 70 mg/l に低減する。

2. 3 実験材料および方法

2. 3. 1 活性汚泥の採取

各施設において細菌の単離は 1995 年 10 月から 1996 年 3 月までの間に行った。槽内水の採取は A 施設では第 1 曝気槽と第 2 曝気槽 2ヶ所から、B 施設ではメタノール処理前、C 施設では第 2 好気性処理工程後、D 施設では SBR 出口で行った。

2. 3. 2 細菌類・酵母の分離

細菌の単離は A 施設と D 施設では各 2 回、B 施設と C 施設では各 1 回行った。採取した槽内水は B 施設以外では、1 時間以内に活性汚泥のフロック形成状態、フロック外の細菌の有無、*Beggiatoa* sp. の有無等の特徴を確認し、第 1 章に従って分離を行った。分離細菌の澱粉分解性を検出するため分離培地は 0.5% のシヤカイト澱粉を添加した A-培地を用い、細菌単離後、各コロニーの澱粉分解性を直接検出した。

2. 3. 3 細菌類・酵母の単離

単離菌株は第 1 章に従って *Bacillus* sp.¹¹⁾¹⁵⁾、ノカルシア型細菌¹³⁾¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、グラム陽性桿菌、グラム陰性桿菌、球菌、および *Clostridium* sp.³¹⁾³⁶⁾ に分類し、生化学的性質を調査した。

2. 3. 4 細菌類・酵母の分解・資化性試験

単離菌株について、澱粉分解性、クックト⁺ミート分解性、油脂分解性、悪臭成分分解・利用性試験を行った。各菌株は16時間・32℃液体培養して用いた。分解性に関与する細菌の割合の計算方法は第1章に従った。

2. 3. 4. 1 澱粉分解試験

細菌の単離時点澱粉分解性を確認した菌株は、再度0.5%澱粉を含んだA-培地で培養し、培養6日後I₂-KI溶液で処理¹⁰⁾¹²⁾しその透明帯の直径を測定し、コロニーの直径との比で活性を表示した。

2. 3. 4. 2 油脂分解試験

脂質の分解テストはTween 80平板培地¹²⁾(A液、ニュートリエントブ⁺ロス0.8W/V%、食塩0.6W/V%、寒天1.5W/V%；B液、1%CaCl₂水溶液；C液、Tween80を別々に121℃、15分間滅菌後無菌的に混合し、無菌的にシャーレに分注して調製した)に前培養した菌液を直径約2mmに撒き32℃で培養を行った。培養24時間後、コロニーの周囲に生じる混濁帯の直径を測定し、コロニーの直径との比で活性を表示した。また、Tween80平面培地を用いて、1991年および1994年に伊那中央衛生センター消化槽から単離した菌株⁷⁾³⁴⁾の油脂分解性を評価したところ、細菌の大豆油分解性の評価と傾向が一致する事を確認した。

2. 3. 4. 3 蛋白質分解試験

実験方法およびクックト[®]ミート分解性判定基準を第1章に従った。単離細菌の前培養液 0.1ml を2本のクックト[®]ミート培地に同時に接種し、5日と10日目にSS減少率を測定した。

2. 3. 4. 4 悪臭成分の分解・利用性試験

悪臭成分の分解性・利用性テストは第1章と同様、硫化水素分解性⁷⁾⁸⁴⁾、アンモニア利用性¹⁰⁾¹²⁾、トリエチルアミン資化性¹⁰⁾¹²⁾から判定した。

2. 3. 5 単離細菌類・酵母の生育性

各施設から単離した細菌を世代時間の測定およびし尿寒天培地での生育性試験を行い、クックト[®]ミート分解性 *Bacillus* sp. の内2~3株を金属イオンの添加試験に供試した。実験方法は第1章に従った。

2. 3. 6 *Bacillus* sp. およびノカルジ[®]A型細菌の種の同定

主にクックト[®]ミート分解性を示した *Bacillus* sp. について諸性質の違いに基づいてそれぞれ数株を選んで種の同定を行った。即ち、

- 1) V-P反応陽性で嫌気性生育性または非生育性を示した菌株。
- 2) 嫌気性非生育性を示した菌株の内、澱粉分解性または非分解性を示した菌株についてである。

A~D施設からそれぞれ10株、2株、6株、6株を供試した。また、D施設から単離したノカルジ[®]A型細菌についても種の同定を試みた。種の同定は菌体の大きさ、V-P反応、嫌気性生育性、澱粉・カゼ[®]イン分解性、parasporal crystals 形成性、50℃での生育性、7%

NaCl 中での生育性および DNA の GC 含量を基に Bergey's Manual¹¹⁾と The Prokaryotes¹⁵⁾に従って同定した。生化学的試験および DNA の GC 含量の測定方法は第 1 章に従った。GC 含量の測定誤差は -0.5~1.3%の範囲とした。なお、同定した菌株について、各種の炭水化物の資化性から細菌を同定するキットである Biolog 社の MicrologTM 1 System (クンゼ産業) 用いて同定を試み、同定の参考とした。

2. 4 結果

2. 4. 1 総細菌数

Table 2-2 および Table 2-3 に各施設の総細菌数を示した。細菌数は A 施設で $3 \times 10^7 \sim 2 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$ 、B 施設で $6 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$ 、C 施設で $7 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$ であった。これらの値はいずれも伊那中央衛生センターに近かった (Table 1-3)。D 施設の総細菌数は約 $9 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11} \text{ cfu/ml}$ であり、伊那中央衛生センターより 100 倍多かった。この施設では槽内水中の細菌が観察可能であり、伊那中央衛生センターと異なった (Fig. 2-2)。この槽内水の顕微鏡観察で *Bacillus sp.* の孢子以外に $0.5 \mu\text{m}$ 以下の桿菌が認められたが、これらは単離の結果、グラム陽性の桿菌であることが判明した (Table. 2- 4d(2))。

A、B、C 施設では 10^6 倍希釈段階の平板を単離に用い、D 施設では 10^6 の希釈段階ではコロニーの重なりが多いため、 10^8 の平板を用いた。各施設はコロニーが 70~100 個前後に出現した平板 1 枚を選び、全コロニーの 50~70% のコロニーを単離した。

A施設は74株を単離し、その内の10株は第4槽から単離した。B施設は46株、C施設は42株を単離した。D施設は1回目から50株、2回目は1回目に単離できなかった67株を単離した。

2.4.2 優占細菌の割合

Table2-3に各施設の優占細菌数の割合を示した。単離した菌株は*Bacillus* sp.、グラム陽性桿菌、グラム陰性桿菌、球菌、*Clostridium* sp.より成っていた。また、酵母も検出された。ノカルシア型細菌はD-施設以外に検出しなかった。

2.4.2.1 A施設

A施設の第1曝気槽では*Bacillus* sp.が59%、グラム陽性桿菌が10%、グラム陰性桿菌が13%、球菌が10%、*Clostridium* sp.が5%を占めた。酵母は3%を占めた。第2曝気槽では*Bacillus* sp.が56%、陽性桿菌が34%、グラム陰性桿菌が9%、球菌が1%を占めた。

Bacillus sp.の割合は第1槽と第2槽とほぼ同数であった。グラム陽性桿菌は24%まで増加した。ほとんどの菌株は第1曝気槽と第2曝気槽で出現した。この施設の細菌相は伊那中央衛生センターの細菌相と似ているが、ノカルシア型細菌は単離できなかった。

2.4.2.2 B施設

B施設では*Bacillus* sp.が30%、グラム陽性桿菌が36%、グラム陰性桿菌が22%、*Clostridium* sp.が12%を占めた。曝気槽第4槽で

Clostridium sp.が単離されたことに加え、*Beggiatoa* sp.が観察された。

2. 4. 2. 3 C施設

C施設では *Bacillus* sp.が 42%、グラム陽性桿菌が 43%、グラム陰性桿菌が 7%、球菌が 8%を占めた。B、C両施設の細菌相では、伊那中央衛生センターに比べて *Bacillus* sp.の菌体数が少なく、ノカルシア型細菌が単離出来ない点が異なっていた。

2. 4. 2. 4 D施設

D施設では総細菌数が最高 1×10^{11} cfu/ml と飽和に近い菌体濃度であった。細菌の割合は *Bacillus* sp.が 21%、グラム陽性桿菌が 48%、グラム陰性桿菌が 11%、球菌が 4%、ノカルシア型細菌が 9%、*Clostridium* sp.が 8%を占めていた。処理に重要と考えられる *Bacillus* sp.とノカルシア型細菌の菌体数の割合は低いが、それぞれの細菌数は最高 2.1×10^{10} cfu/ml、 8×10^{10} cfu/mlであって、伊那中央衛生センターの施設に比べてそれぞれ約 27倍、50倍多かった。

2. 4. 3 単離細菌類の分解・資化性

基質分解性に関わる総細菌数の割合は Table 2-5 に示した。全ての施設から単離した細菌の内、*Bacillus* sp.以外の菌株はクワトニート分解性を示さなかった。澱粉分解性を示した菌株の内、A施設が 1株、C施設が 1株および D施設 2株以外全て *Bacillus* sp.とノカルシア型細菌であった。

脂質分解性を示す細菌数は A、B、C 施設では伊那中央衛生センターに比べて低かった。D 施設で存在する油脂分解性の細菌はほとんどがグラム陽性桿菌で、油脂分解性を示す細菌数は 2.3×10^{10} cfu/ml と伊那中央衛生センターの 4.7×10^8 cfu/ml に比べ約 49 倍であった。また、伊那中央衛生センターでは *Bacillus* sp. とノカルシア型細菌が油脂分解性に関わっている点が異なっていた。

各施設から単離した菌株のほとんどが、澱粉・蛋白質・油脂分解性と関係なく、し尿寒天培地でよく生育した。この事はこれらの細菌がし尿処理に関係していることを示している。

2. 4. 3. 1 A 施設

A 施設の第 1 曝気槽では澱粉、クックトミートおよび油脂分解性細菌数の総細菌数に対する割合はそれぞれ 26%、48%、7% で、第 2 曝気槽ではそれぞれ 27%、47%、13% であった (Table 2-4b(1)、Table 2-4b(2)、Table 2-5)。第 1 曝気槽と第 2 曝気槽で比較すると澱粉、クックトミートおよび油脂の分解性を示す細菌数の割合はほぼ同数であった。*Bacillus* sp. は大部分が澱粉・クックトミート分解性または、クックトミート分解性のみを示した。油脂分解性を示す菌株は全体で 6 株と少なく、*Bacillus* sp. では 3 株が油脂分解性を示したが、活性は弱かった。クックトミート分解性を示した *Bacillus* sp. の世代時間は 43~82 分以上で伊那中央衛生センターから単離した菌株³⁴⁾に比べて約 2~4 倍であった。この施設では、高濃度臭気を曝気槽に吹き込むことによって脱臭効率を高めているが、硫化水素分解性・トリエチルアミン資化性を示す細菌数は 15%、9% と少なかった。

た。資化性に関する菌株は *Bacillus* sp.、グラム陽性桿菌および球菌に見られ、酵母にも見られた。アンモニア利用性を示す細菌数は64%を占めた。脱窒性を示す菌株数は第1曝気槽と第2曝気槽を通じて4株(6%)と少なかった。

2. 4. 3. 2 B施設

B施設の曝気槽出口では澱粉分解性、ククト[®]ミート分解性、油脂分解性に関わる細菌数の割合は2%、22%、2%を占め、澱粉分解性、油脂分解性を示す細菌数は少なかった(Table 2-4b、Table 2-5)。単離された *Bacillus* sp. はほとんどがククト[®]ミート分解性を示し、澱粉・ククト[®]ミート分解性菌株、油脂分解性菌株はそれぞれ1株であった。

この施設では2回の脱窒工程を取り入れているが、伊那中央衛生センターの第4槽槽内水と比較してT-Nの値は上澄液で低いが、アンモニア態-Nでは高かった(Table 2-1)。これはアンモニア利用性の細菌数が多いが炭水化物や油脂の分解性が低いため炭素源が不足している事も1要因と考えられる。悪臭成分の内、トリethylアミン資化性を示す細菌数は多かった。硫化水素資化性を示す細菌数の割合は約19%を占め、伊那中央衛生センターの場合より低かった。世代時間も40分以上と長かった。脱窒性を示す菌株は5株(総細菌数の9%)と少なかった。

2. 4. 3. 3 C施設

C施設の最終曝気槽からは澱粉分解性、クックト[®]ミート分解性、油脂分解性細菌数の割合は24%、21%、20%であった (Table 2-4c、Table 2-5)。単離された *Bacillus* sp.の内6株 (*Bacillus* sp.の38%)が澱粉・クックト[®]ミート分解性を示し、澱粉分解性、クックト[®]ミート分解性のみを示す菌株はそれぞれ2株 (13%)であった。*Bacillus* sp.による油脂分解性は低いが、グラム陽性桿菌、グラム陰性桿菌、球菌にも油脂分解性を示す菌株が見られた (Table 2-4c)。

各悪臭成分分解性・利用性を示す菌株が多かった。脱窒性を示す菌株は5株で総細菌数の11%であった。悪臭成分の分解性を示す細菌数の割合は全般的に高かった (Table 2-5)。この施設では1991年伊那中央衛生センターの汚泥を投入して処理の改善をはかり、さらに第2脱窒工程を好気性処理工程に変更して現在の状態に至っている。1991年と1994年に伊那中央衛生センターの活性汚泥細菌の分析を行っているので⁷⁾³⁴⁾、両処理場の細菌相の違いを偶然明らかにすることが出来た。

2. 4. 3. 4 D施設

D施設では澱粉分解性、クックト[®]ミート分解性、油脂分解性を示す細菌数の割合は11%、9%、23%であった (Table 2-5)。澱粉分解性菌株は *Bacillus* sp.とノカルシア型細菌、クックト[®]ミート分解性菌株は *Bacillus* sp.、油脂分解性菌株はグラム陽性桿菌が関係していた (Table 2-4d(1)~2-4d(4))。澱粉分解性と蛋白質分解性の菌株数の割合は低かったが、総細菌数が多いため分解に関与する細菌

数は何れの施設より多く、特に油脂分解性に関係した細菌数は多いことが判った。

硫化水素資化性、アンモニア利用性およびトリエチルアミン資化性を示す細菌数の割合はそれぞれ31%、44%、15%であった。脱窒性を示す細菌の割合は約17%であり、伊那衛生センターの脱窒性を示す細菌の割合に近かった。この施設の汚泥生成量はA、B、C、Dの4施設中では最も少なかったがこの事実は澱粉、蛋白質、油脂分解性に関わる細菌数から説明できた。

2.4.4 単離細菌類の生育

2.4.4.1 し尿寒天培地による生育

単離細菌はほとんど単独でし尿寒天培地で生育性を示した。この事はこれら単離菌株がし尿の処理に関わっている事を示している。C施設から単離したし尿寒天培地で生育しないNo.20株を生育するNo.1株と混合してし尿寒天培地で培養すると、No.20株は生育性を示した(Fig. 2-4)。

2.4.4.2 金属イオンの添加に及ぼす生育の影響

Fig 2-5およびTable 2-6にA施設、B施設、C施設およびD施設から単離した菌株に対する金属イオンの生育影響を示した。これらの菌株は Mg^{2+} または、 Mg^{2+} とSiを添加すると無添加の場合に比べて世代時間の短縮には顕著な効果を示さなかったが、指数期が約2時間延長した。OD値が無添加の場合に1.00~1.07を示し、 Mg^{2+} を添加した場合は1.01~1.33、 Mg^{2+} とSiを混合して添

加すると 1.07~1.28 を示した。また、 Mg^{2+} と $Mg^{2+}+Si$ を添加しない培地では全ての菌株が長いフィラメントを形成し (Fig. 2-3a、培養 8 時間) その後 8 時間以上フィラメントは維持された。 Mg^{2+} または、 $Mg^{2+}+Si$ を添加した培地ではフィラメントは短く桿菌となった (Fig. 2-3b、培養 8 時間)。以上のことから Mg^{2+} または $Mg^{2+}+Si$ の添加は *Bacillus* sp. の指数期の延長による菌体濃度の増加およびフィラメント形成を阻害する効果のあることを再確認した⁸⁾。

2. 4. 5 *Bacillus* sp. およびノカミ⁷型細菌の種の同定

A~D 施設から単離した *Bacillus* sp. の内、種の同定を試みた菌株を Table 2-7 に示した。

2. 4. 5. 1 A 施設

A 施設から単離した No.1、No.2、No.4、No.5、No.6 の 5 株は V-P 反応陽性、嫌気性生育性、50°C および 7% NaCl 中生育性を示した。Slepecky 等の表¹⁵⁾からこれらは *B.licheniformis*¹⁵⁾¹⁸⁾ と考えられた。しかし、菌株 No.1、No.2、No.4、No.5 は澱粉の可溶化能を示さない点は *B.licheniformis* と異なっていた。MicrologTM 1 system による同定では No.2 株は *B.licheniformis* であり、No.4 株は *B.subtilis* と同定された。No.2 株と No.4 株の DNA の GC 含量は 41% であり、*B.licheniformis* の文献値 (42.9%~49.9%)¹¹⁾¹⁵⁾ より 1.5% 低く、*B.subtilis* の文献値 (41.5%~47.5%)¹¹⁾¹⁵⁾ に近かった。*B.subtilis* は嫌気性非生育性であるので、これらの菌株は同定出来なかった。

No.1株とNo.5株は固まりを形成して MicrologTM 1system では同定できなかつた。No.1株とNo.5株は澱粉の分解性以外、アンモニア利用性も示し、*B.licheniformis*の性質に一致し、DNAのGC含量も42%と44%であり、*B.licheniformis*のGC含量の文献値と一致したので、*B.licheniformis*と同定した。

No.6株は MicrologTM 1 system で *B.licheniformis*と同定され従来法による同定結果と一致した。

No.7、No.9、No.21株はV-P反応陽性、嫌気性非生育性、澱粉とカゼインを可溶化したので *B.subtilis* と推定した。MicrologTM 1 system では、No.21株が *B.licheniformis*と同定された。No.7、No.9、No.21株のDNAのGC含量は42%~45%であり、*B.subtilis* および *B.licheniformis*の文献値と一致した。これら3株は嫌気性非生育性であるので *B.subtilis*と同定した。*B.subtilis*はアンモニア利用性を示さないが、これら3株はアンモニア利用性を示す点が特異的である。MicrologTM 1 system の結果から、このことは *B.licheniformis*の性質を有するためであると推定できた。

No.3株はV-P反応陰性、嫌気性生育性、50℃および7% NaCl 中生育性を示した。Slepecky等の表や Bergey's Manual から相当する菌株は見当たらなかつたので、同定出来なかつた。また、MicrologTM 1 system では *B.licheniformis*と同定されたが決定できなかつた。

No.11株はGC含量を測定したが、対応する生化学的性質を示す種が見あたらず、同定できなかつた。

2. 4. 5. 2 B施設

B施設から単離した No.1株と No.2株は V-P反応陽性、嫌気性非生育性、澱粉非分解性、カゼイン分解性であるので、*B.pumilus*¹¹⁾¹⁵⁾と同定した。DNAのGC含量は43%~45%であり文献値(39.0%~45.1%)¹¹⁾¹⁵⁾と一致した。

2. 4. 5. 3 C施設

C施設から単離した No.1、No.2、No.3、No.7、No.8、No.9株は V-P反応陽性、嫌気性生育性、50℃および7% NaCl中生育性を示したので *B.licheniformis*と同定した。No.7は澱粉非分解性である点が *B.licheniformis*と異なるが、No.7とNo.8株は MicrologTM 1 systemによる同定では何れも *B.licheniformis*と同定され、上記の結果を支持した。DNAのGC含量は43%~47%であって *B.licheniformis*の文献値の42.9%~49.9%と一致した。No.9株は澱粉分解性、カゼイン非分解性を示した点が異なるが、この菌株も同じく *B.licheniformis*と同定した。DNAのGC含量は45%であり、文献値と一致した。

2. 4. 5. 4 D施設

D施設から単離した菌株の内、No.1、No.4、No.6、No.9株は V-P反応陽性、嫌気性非生育性、澱粉非分解性、カゼイン分解性を示したので *B.pumilus*と考えられた。DNAのGC含量は42%~47%であり、*B.pumilus*の文献値(39%~45.1%)にほぼ一致した。No.6株とNo.9株に対する MicrologTM 1 systemによる同定では何れ

も *B. amyloliquefaciens* と同定された。*B. amyloliquefaciens* は 50℃ で非生育性、澱粉可溶性であるので¹¹⁾¹⁵⁾、No.6 株と No.9 株は *B. pumilus* と同定した。No.1、No.4 株もそのように同定した。これら 4 株はアンモニア利用性を示し *B. licheniformis* の性質を示した¹¹⁾¹⁵⁾。

No.7、No.12 株は V-P 反応陽性、嫌気性生育性、50℃ および 7% NaCl 中生育性を示し、paraspore crystals を形成せず澱粉・セルロース分解性を示したので、*B. licheniformis* と同定した。DNA の GC 含量は 43%~47% であり、*B. licheniformis* の文献値と一致した。No.7 株と No.12 株に対する Microlog™ 1 system による同定では *B. licheniformis* と同定され、従来法と一致した。

各施設から単離した *Bacillus* sp. の内、クックトミート分解性の菌株には、ここに同定した菌株以外 V-P 反応陽性、嫌気性生育性/非生育性を示す菌株が見られた。以上の同定の結果から、これらは *B. licheniformis*/*B. pumilus*、*B. subtilis* と推定される。同定された *B. licheniformis* には澱粉分解性を示さない点で *B. pumilus* の性質を示す菌株が存在し、一方、*B. pumilus* と *B. subtilis* と同定された菌株は大部分がアンモニア利用性を示し、*B. licheniformis* の性質を示す菌株が存在することが判った。また、*B. pumilus* と同定した菌株は硝酸イオン利用性を示し、*B. licheniformis* または *B. subtilis* の性質を示すことが判明した。

D 施設からノカルシア型細菌を単離したが、No.111、No.112、No.113、No.114 株は運動性を示すので *Oerskovia* sp. と考えられる (Table 2-4d3)。Microlog™ 1 system で No.113、No.114 株を同定したと

ころ *O. turbata* と同定され、DNA の GC 含量は 69% を示したので *O. turbata* ¹³⁾¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁶⁾ と同定した。No.112 株も DNA の GC 含量は 72% と一致したので *O. turbata* と同定した。No.111 株はリゾチムで溶解しがたく、DNA を単離することが出来なかった。

2. 5 考察

2. 5. 1 汚泥の生成率と細菌相の生化学性質との関連性

Table 2-1 に伊那中央衛生センター、A 施設、B 施設、C 施設、D 施設における総細菌数に対する各基質分解性細菌数の割合を示した。既述したように伊那中央衛生センターにおける処理状況はし尿の分解性が最も進行していると考え、この施設の処理状態を基準として各施設の処理状態と比較した。

A 施設は滞留時間が最も長いが汚泥生成率が 90% と最も高く、し尿の分解が最も悪いと考えられる。これは曝気量の不足により、好気性細菌の増殖が不活発であるためと考えられる。また、*Bacillus sp.* が生存しているが、曝気不足に加え世代時間が 40 分以上であり、増殖が遅く BOD 成分の資化速度が遅いことが挙げられる。また、*Bacillus sp.* およびその他の細菌による油脂分解性菌株が少なく（4~6 株、細菌数の 8~13%）、不溶性油脂成分が分解されないこと、このため炭素源が十分に供給されないため細菌の増殖が不活発になる事も要因と考えられる。

B 施設では汚泥生成率が 39% と 2 番目に高かった。単離細菌中油脂分解性菌株は 1 株（総細菌数の 2%）と低く、澱粉分解性菌株も 1 株（総細菌数の 2%）と低かった。澱粉分解性細菌数も少ない

ため汚泥生成率はもっと高いと考えられるが、この施設では好気性処理工程後、嫌気性処理を行っているので、この工程によって汚泥の分解が促進されている可能性が考えられる。

C施設の汚泥生成率は7.8%であって、し尿のSS成分の分解が良好に進行していると考えられる。この施設では澱粉分解性細菌数24%、ククトミート分解性21%、油脂分解性20%と各種基質分解性細菌が存在していた。しかし、油脂分解性細菌はグラム陽性桿菌類が最も多いため、これらの細菌の菌体濃度の維持が困難と考えられる⁷⁾³⁴⁾が、実際に汚泥生成率は変動するとのこと

である。この処理施設ではB施設における脱窒処理工程を好気性処理工程に変更して運転を行っており、曝気工程を増加していることによって酸素の供給が増加し汚泥生成量が減少していることが考えられる。

D施設では滞留時間2.5時間で汚泥生成率が5.7%と低く、比較的安定した効率的な運転を行っている。この施設では総細菌数が他の施設に比べて100倍以上多く、グラム陽性桿菌の細菌数が48%を占めていた。澱粉分解性、蛋白質分解性に関与する細菌数の割合は低いが、総細菌数が多いため、各基質の分解に関与する細菌数は他の施設に比し数十倍多い。この為、短時間で処理が終了し、汚泥生成量が少ないと考えられる。この施設でも、油脂分解性の菌株はほとんどがグラム陽性桿菌であった。この為、処理の変動が推定される。油脂分解性細菌数はこの施設では他の施設の50~100倍であった。このため、短い処理時間で処理が進行し汚泥生成量が少ないものと考えられる。

以上から、脱窒工程を最初に設置している施設では汚泥生成率が高くなる傾向が見られたので、運転の際曝気不足にならないよう注意する必要があることが判った。また、効率的な無臭し尿処理には活性汚泥細菌群の澱粉分解性、蛋白質分解性、油脂分解性がともに高く、細菌相は *Bacillus sp.* とノカルシア型細菌が優占していることが有利かつ必要であることを再確認した(7)9)34)35)。また、長時間消化方式では油脂分解性細菌数の割合が13%以下(細菌数約 $2.5 \times 10^8 \text{ cfu/m}$ 以下)の場合汚泥生成率が高くなり、油脂分解性細菌数20~47%以上(約 $4 \times 10^8 \text{ cfu/m}$ 以上)存在すると汚泥生成率が低くなることおよび分解性に関与する *Bacillus sp.* の世代時間の長短も汚泥生成率と関係することも明らかとなった。

2. 5. 2 脱窒機構について

本研究において、初段に嫌気処理工程を備えた施設でも脱窒性を示す菌株・細菌数は少ないことが判った。この事実は脱窒工程で脱窒性細菌による脱窒は効率よく行われていない可能性を示している。一方、今回単離した *Bacillus sp.* やグラム陽性桿菌は大部分硝酸イオン利用性を示し亜硝酸を生成することが判った。また、伊那中央衛生センターから単離した同様の細菌群でも同様のことが判っている(7)34)。伊那中央衛生センターで第1槽の曝気量を全曝気量の約70%とし、約30%を3槽の曝気に用いているが、T-Nは大幅に減少している。これらの事実から、し尿処理では細菌によってアンモニアが酸化されて硝酸イオンが生成し、これが微嫌気性

条件下亜硝酸イオンに変化し、生成した亜硝酸イオンが細菌によって生成したハフチドやアミノ酸等の1級アミンと化学的に反応してシアニウム塩を生成し、これが分解して脱窒が起こっている可能性を今後検討する必要があると考えられる。

2. 5. 3 無臭処理機構について

悪臭の発生に関しては次のように考察した。伊那衛生センターの場合、1989年無臭し尿処理が実現して、汚泥生成量や処理水のBOD値の低減、季節変動の解消が見られ、処理に伴う悪臭の低減化と処理状態の効率化とは密接な関係が見られた。A～D処理施設では、B施設の汚泥に悪臭が感じられる以外、汚泥を採取した時点で、特に悪臭は感じなかった。しかし、各施設で処理に変動が見られるとのことであった。B施設では処理槽アンモニア態-N、 95mg/l 、前述したように細菌を分析したところ澱粉と油脂分解性を示した菌株はそれぞれ1株(総細菌数約2%)であった。活性汚泥中の澱粉と油脂を可溶化する細菌類はし尿中の炭水化物を分解すると同時に炭素源の供給を可能にし、C:N比を良好に(100:1と言われている)保つ事にも寄与していると考えられる。以上の事実から、澱粉分解性と油脂分解性の菌株数が少ない場合(澱粉分解性・油脂分解性細菌数2%以下、細菌数で $2 \times 10^7\text{cfu/ml}$ 以下)、悪臭が発生する事が推定された。

2. 5. 4 クックトミート分解性 *Bacillus* sp. の種の特徴

何れの処理施設からも、*Bacillus* sp. で澱粉・クックトミート分解性またはクックトミート分解性を示す菌株が単離された。伊那中央衛生センターから単離された菌株は、1991年では、前者は *B. thuringiensis* と *B. subtilis*、後者は *B. pumilus* より構成され⁷⁾⁹⁾、1994年では大部分前者は *B. subtilis*、後者は *B. pumilus* から構成されていた³⁴⁾³⁵⁾。その際、*B. pumilus* および *B. subtilis* と同定された菌株の多くがアンモニア利用性を示した点を説明できなかった。施設 A~D から単離されたクックトミート分解性菌株の同定から、これらの菌株のアンモニア利用性が *B. licheniformis* の性質を有するためであることが判明した。また、伊那中央衛生センターから単離した *B. pumilus* の大部分が硝酸イオン利用性を示した。硝酸イオン利用性は *B. subtilis* 以外 *B. licheniformis* も示すので¹¹⁾、これらの *B. pumilus* は *B. subtilis*/*B. licheniformis* または、両者の性質を有すると考えられる。即ち、し尿処理の際に出現するクックトミート分解性を示し $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ の *Bacillus* sp. の菌株は、*B. subtilis* に *B. pumilus* と *B. licheniformis* の性質が交じった場合、*B. pumilus* に *B. licheniformis* と *B. subtilis* の性質が交じった場合および *B. licheniformis* に *B. pumilus* と *B. subtilis* の性質が交じった場合によって形成されたものと考えられた。MicrologTM1 System の結果を考慮すると、これらの菌株は基本的には *B. licheniformis* または、*B. subtilis* であって、これらに互いの性質が入り交じり、さらに、*B. pumilus* の関与も考えられる。

各施設から単離された *Bacillus* sp. の内、嫌気性生育性を示す菌株が A 施設、C 施設および D 施設でそれぞれ 84%、81%、78% であった。これらの菌株は従来法で *B.licheniformis* と同定され、Microlog™1 System でも同様な同定結果が得られた。このため処理工程が嫌気性に傾く場合には嫌気性生育性を示す *B.licheniformis* の性質が強まっていると推測した。

D 施設から単離したノカルシア型細菌は *O.turbata* と同定し、伊那中央衛生センターのノカルシア型細菌と同じ種であることが判明した。

これまで、下水処理では処理に働く細菌はグラム陰性桿菌であるとされているが⁵⁾³⁷⁾、し尿処理ではグラム陽性桿菌群が処理に重要であること^{7~9)34)35)38)}が再確認出来た。下水処理における活性汚泥細菌については今後再検討の必要があると考えられる。

2. 6 要約

- 1) 伊那中央衛生センター並びに 4ヶ所のし尿処理施設の汚泥発生率を調査し、汚泥発生率から各施設のし尿処理の状態を評価した。その結果、伊那中央衛生センター(3.3%)、D 施設(5.7%)、C 施設(7.8%)、B 施設(39%)、A 施設(90%)の順序であった。
- 2) 各施設の総細菌数は、A 施設で $10^7 \sim 10^9$ cfu/ml、B および C 施設で $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml であっていずれも伊那中央衛生センターに近かった。D 施設の総細菌数は約 $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/ml であり、伊那中央衛生センターより 100 倍多かった。優占細菌は *Bacillus* sp、グラム陽性桿菌、グラム陰性桿菌、球菌、ノカルシア型細菌、*Clostridium* sp. に分類して細菌数を計測した。何れの施設に

も *Bacillus* sp. が高い割合で占めていた。ノカルシア型細菌は D 施設以外に単離されなかった。

- 3) 各菌株の澱粉分解性、蛋白質(カゼイン・クックトミート)分解性、油脂(Tween 80)分解性および硫化水素資化性、アンモニア利用性、トリエチルアミン資化性、脱窒性を調べ、関与する細菌数を計測した。汚泥生成率の高い施設では澱粉分解性細菌数や蛋白質分解性細菌数の割合が高くても、油脂分解性細菌数が少ない事(13%以下)が判った。また、汚泥生成率の低い施設では、澱粉分解性細菌数、蛋白質分解性細菌数が多く、油脂分解性細菌数の割合も高かった(20%以上)。悪臭の発生は澱粉分解性細菌数と油脂分解性細菌数が少ない場合に見られることを示唆した。
- 4) し尿寒天培地による生育試験の結果からほとんどの単離細菌は単独でし尿寒天培地で生育性を示し、し尿の処理に関わっていることを示した。また、金属イオンの添加に及ぼす生育の影響試験の結果から Mg^{2+} と $Mg^{2+}+Si$ の添加 *Bacillus* sp. の世代時間の短縮、菌体濃度の増加およびフィラメント形成を阻害する効果を再確認した。
- 5) 単離した *Bacillus* sp. の一部とノカルシア型細菌の種を同定した。クックトミート分解性菌株が *B.licheniformis*、*B.pumilus*、*B.subtilis*であることを明らかにした。同時に、1994年に単離したクックトミート分解性の *B.pumilus* や *B.subtilis* のアンモニア利用性が *B.licheniformis* の性質と関係していることを明らかにした。D 施設から単離したノカルシア型細菌は *O.turbata* と同定した。

Table 2-1 The comparison of the ratio of the excess sludge-volume to the charge, and night soil-treated water quality at Inachuo, A-, B-, C- and D-facilities.

Facilities	Inachuo	A	B	C	D	
Analytical date	Nov., 1994	Jan., 1996	Mar., 1990	Apr., 1996	average/ 1996	
Treatment process	Aerobic	anaerobic 90% oxygen aerobic	anaerobic aerobic anaerobic	anaerobic aerobic aerobic	anaerobic aerobic (SBR)	
Charge (specification, Kl/day)	200	80	20	10	100	
Actual charge *(Kl/day)	289	50	11.8	8.1	97	
Dilution (xQ)	0	2.9-4	0	0	0	
MLSS (kg/l)	8000-10000	7000-8000	15000	12000-15000	8500-10500	
pH	4.8-5.5	6.45-6.63	7.0-7.3	-	6.7	
Residence time (hr)	48	300-422	25	45	2.5	
Returning sludge ration (xQ)	6	0.58	9.3	4	2	
Ratio of excess sludge to charge (%)	3.3	90	39 (23)	7.8	5.7	
Water content (%)	79	82	89 (80)	82	81	
mg/l	treated water					
BOD	mixed liquor	1890	115	-	1200	887
	supernatant	8.3	-	16	10	38.5
SS	mixed liquor	8635	6214	-	-	8000
	supernatant	<1	-	-	-	71.8
COD	mixed liquor	2750	60.4	-	-	3940
	supernatant	143.5	-	680	-	616
T-N	mixed liquor	775	8.7	-	-	772
	supernatant	230	-	170	-	74.5
ammonia-N	supernatant	54.5	3.9	93	-	13.1
T-P	mixed liquor	210	501	-	-	407
	supernatant	90	-	-	-	65.3

* The charge contained excess sludge from septic tanks of domestic waste water in the ratio of 7-11%
 -, Not determined

Table2-2. Number of microorganisms detected from the treatment tanks of night soil.

Plates No	A		B	C	D
	ADT- I	ADT- II			
	10^6				10^8
1	163 b	78	73	69 a	130 c
2	82	4 a	69	70	110
3	86	18	76	77	101
4	85	76	67	66	88
5	83	66	77	110	87
6	87	71	71	71	120
7	85	76	81	88	94
8	98	80	57	68	109
9	66	73	58	76	120
10	59	112	60	72	88
11	3 a	84	102 b	81	85 d
12	30	97	55 a	152 b	/
13	8	81	56	/	/
14	60	151 b	71	/	/
15	61	80	62	/	/
16	61	92	/	/	/

a , The lowest number of colonies detected

b , The highest number of colonies detected

The number of bacteria = $a \times 10^6 \sim b \times 10^6$ cfu/m/

= $c \times 10^8 \sim d \times 10^8$ cfu/m/

ADT- I , The first aerobic digestion tank

ADT- II , The second aerobic digestion tank

Table 2-3. The number of miroorganisms detected from the treatment tanks of night soil at Inachuo, A, B, C and D facilities, and the ratio of each bacterium.

Miroorganisms	Inachuo.		A		B	C	D
	ADT- I	ADT-IV	ADT- I	ADT- II			
	%	%	%	%	%	%	%
<i>Bacillus</i> sp.	58-77	43-73	59	56	30	42	21
Gram-positive rods	12-16	15-27	10	34	36	43	48
Gram-negative rods	2-5	9-16	13	9	22	7	11
Cocci	2	2	10	1	-	8	4
Nocardioform bacteria	10-18	5-10	-	-	-	-	9
<i>Clostridium</i> sp.	3	1	5	-	12	-	8
Yeasts	0.1	0.1	3	-	-	-	-
Number of bacteria (cfu/ml)	$6 \times 10^8 - 1 \times 10^9$	$4 \times 10^8 - 3 \times 10^9$	$3 \times 10^7 - 2 \times 10^9$	$4 \times 10^7 - 2 \times 10^9$	$6 \times 10^8 - 1 \times 10^9$	$7 \times 10^8 - 2 \times 10^9$	$9 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11}$

ADT- I ,the first aerobic digestion tank; ADT-IV, the fourth aerobic digestion tank
ADT- II ,the second aerobic digestion tank.

Table 2-4a(1) The biochemical characteristics of *Bacillus* sp., gram-positive rods isolated from A-facility.

No	Gram	Size (μm)	Spora		Cata	Oxi	Moti	Anaero	Denit	Me		Ind	Use of			Hydrolysis			meat	G-	Night
			Spore	ngum						Glucose	thyl		NO ₃	NaSH	NH ₃	ami	Sta	Cas			
<i>Bacillus</i> sp.																					
1	+	0.6x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	86	80	+
2	+	0.6x3.5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	88	57	+
3	+	0.6x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	2	+	88	57	+
4	+	0.8x2.5	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	86	48	+
5	+	0.6x3.5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	87	53	+
6	+	0.6x4	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	4	+	-	90	43	+
7	+	0.6x3.5	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	2	+	92	59	+
8	+	0.6x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	82	82	+
9	+	0.6x3.5	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	5	-	81	69	+
10	+	0.6x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	6	+	86	59	+
11	+	1x4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	94	+	+
12	+	0.6x3.5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	85	55	+
13	+	0.6x3.5	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	5	-	85	70	+
14	+	0.6x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	85	82	+
15	+	0.8x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	5	+	82	56	+
16	+	0.6x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	82	81	+
17	+	0.8x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	4	+	81	55	+
18	+	0.6x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	81	82	+
19	+	0.8x3	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	4	+	76	59	+
20	+	0.7x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	72	82	+
21	+	0.6x3	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	5	+	89	53	+
22	+	8	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	5	+	82	58	+
23	+	0.6x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	81	82	+
24	+	0.8x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	9	+	81	50	+
25	+	0.6x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	80	81	+
26	+	0.8x3	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	7	+	79	55	+
27	+	0.6x3.5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	6	+	88	46	+
28	-	0.3x3	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	296	+	+
29	+	0.3-0.5x3	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3	-	196	+
30	+	0.8x3	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	2	-	262	+	+
31	+	0.5x3	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	ND	ND	+
32	+	0.5x2.5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	451	+	+
*33	+	0.7x3.5	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	2	+	92	69	+
*34	+	0.7x3.5	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	90	55	+
*35	+	0.8x2.5	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	4	+	72	65	+
*36	+	0.7x3.5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	88	56	+
*37	+	0.7x3.5	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	1	+	80	82	+
Gram-positive rods																					
38	+	0.3-0.5x3	G	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	ND	+	+
39	+	0.5-0.6x3	G	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	ND	+	+
40	+	0.3x2.5	-	-	+	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	5	-	ND	ND
41	+	0.5x2.5	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	312	+	+
42	+	0.5-0.6x3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	ND	+	+
43	+	0.5-0.6x3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	ND	+	+
*44	+	0.3x3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	ND	+	+
*45	+	0.3x2.5	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	5	-	ND	+
*46	+	0.6x3.5	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	ND	+	+
*47	+	0.5x3	G	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	ND	+	+

* isolated from the second aeration tanks. G, granules like spores, which did not survive at 60°C for 20 min.
 ND, No data could be obtained.

Table 2-4c The biochemical characteristics of *Bacillus* sp., gram positive—rods, gram—negative rods and Cocci isolated from C—facility.

No	Gram	Size	Spora		Cata	Oxi	Moti	obic	Denit	Me				Use of			Cooked		G—	Night			
			Spou	ngiu						Glucose	thyl	Ind	ami	sta	cas	meat	G—	Night					
			res	swollen	lase	dase	lity	growth	cation	O	F	red	V—Fole	NO ₃	NaSH	NH ₃	ne	rch	ein	oil	reduced	time	soil
																					%	min	
<i>Bacillus</i> sp.																							
1	+	0.7x5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	14	+	-	82	38	+
2	+	0.8x5	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	5	+	-	83	30	+
3	+	0.6x3	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	1	+	-	87	33	+	
4	+	0.6X3	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	5	+	-	88	29	+
5	+	0.8x3	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	9	+	-	88	28	+
6	+	0.8x3	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	88	32	+
7	+	0.8x3	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	89	33	-
8	+	0.7x5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	10	+	-	90	35	+
9	+	0.8x5	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	5	-	-	-	37	+
10	+	0.3x2.5	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	206	+
11	+	1.8x3	+	+	+	-	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
12	+	1.6x3	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	4	-	1	-	29	+
13	+	0.5x3	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	65	+
14	-	0.5x3	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	63	+
15	+	0.7x5	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	7	-	35	+
16	+	0.3x3	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	68	+
Gram—positive rods																							
17	+	1x2.5	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	9	+	2	-	ND	-
18	+	1.1x3	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	101	-
19	+	0.3x3	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	ND	-
20	+	0.3X3	G	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	ND	-
21	+	0.5x2.5	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	ND	+
22	+	0.5x2.5	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	155	+
23	+	0.2x2.5	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	295	+
24	+	0.6x3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	321	+
25	+	0.5x2.5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	ND	+
26	+	0.3x3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	40	+
27	+	0.3x3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	ND	+
28	+	0.5x3	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	ND	+
29	+	0.2x2.5	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	ND	+
30	+	0.2x2.5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	ND	ND	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
31	+	0.5x2.5	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	3	-	ND	+
Gram—negative rods																							
32	-	0.2x3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	237	-
33	-	0.4x3	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	2	-	183	-
34	-	0.3x2.5	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	1	-	ND	+
35	-	0.5x3	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	3	-	97	+
36	-	0.3x2.5	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	123	+
37	-	1x5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	137	+
Cocci																							
38	+	1.8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	2	-	ND	+
39	+	1.5	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	1	-	53	+
40	+	1.8-2	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	2	-	51	+
41	+	1.8	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	2	-	176	-
42	+	1.5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	ND	+

G, granules like spores, which did not survive at 60°C for 20 min. ND, No data could be obtained.

Table 2-4b. The biochemical characteristics of *Bacillus* sp., gram positive-rods, gram-negative rods and *Clostridium* sp. isolated from B-facility.

No	Gram	Size(μ m)	Spore		Cata	Oxi	Moti	obic	Denit	Me		Use of					Cooked								
			Spo	ngium						Glucose	thyl	Ind	ami	sta	cas	meat	G-	Night							
			res	swollen	lase	dase	lity	growth	cation	O	F	red	V-Pole	NO ₃	NaSH	NH ₂	ne	rch	ein	oil	reduced	time	soil		
<i>Bacillus</i> sp.																									
1	+	0.7x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	90	32	+	
2	+	0.7x3	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	89	25	+	
3	+	0.6x2.5	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	3	-	53	+	
4	+	0.3x2	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	292	+	
5	+	0.7x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	88	63	-	
6	+	0.8x3.5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	202	+	
7	+	0.3x3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	62	156	+	
8	+	0.8x3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	79	106	-	
9	+	0.5x3	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	120	+	
10	+	0.3x3	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+	
11	+	0.7x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	87	46	+	
12	+	0.6x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	72	43	+	
13	+	0.6x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	76	40	+	
14	+	0.6x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	88	52	+	
15	+	0.8x2.5	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	90	63	-	
16	+	0.7x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	73	55	+	
17	+	0.7x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	82	50	+	
18	+	0.6x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	83	43	+	
19	+	0.8x3	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	7	+	88	60	+
Gram-positive rods																									
20	+	0.3x5	G	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	-	
21	+	0.3x3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	
22	+	0.3x3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	
23	+	0.3x3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	
24	+	0.3x3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	
25	+	0.3x3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	
26	+	0.3x3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	
27	+	0.3x3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	
28	+	0.5x3.5	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	145	+	
29	+	0.5x4	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	268	+	
30	+	0.3x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	ND	+	
31	+	0.3x3	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	95	+	
Gram-negative rods																									
32	-	0.3x2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	+	-	-	ND	ND	
33	-	0.3x2.5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	227	+	
34	-	1.5x2.5	-	+	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	
35	-	0.2x3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	127	+	
36	-	0.3x1.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	ND	
37	-	0.5x3.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	
38	-	0.3x5	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	
39	-	0.5x3.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	
40	-	1.3x3	-	+	+	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	
<i>Clostridium</i> sp.																									
41	+	0.2x2	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	
42	+	0.3x3	+	-	-	ND	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	
43	+	0.3x2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	
44	+	0.5x2.5	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+	
45	+	0.5x2.5	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	
46	+	0.5x2.5	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	

G, granules like spores, which did not survive at 60°C for 20 min. ND, No data could be obtained.

Table 2-4d(3) The biochemical characteristics of gram-negative rods, Cocci, Nocardioform bacteria and *Clostridium* sp. isolated from D-facility.

No	Gram	Size(μ m)	Spora		Cata- lase	Moti- lity	Anaerobic growth	Denit- rifi- cation	Me			Indole	Use of				Hydrolysis		Cooked meat Oil reduced	G- time	Night soil	
			Spore res	ngium swollen					Glucose	thyl	red		V-P	NO ₃	NaSH	NH ₃	Amine	Sta- rch				Cas- ein
Gram-negative rods																						
86	-	0.8x5	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	41	+
87	-	1.8x4	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	6	+	-	-	46	+
88	-	1.3x3.5	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
89	-	0.2x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	415	+
90	-	0.3x3.5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	138	-
91	-	0.5x3.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	524	+
92	-	0.3x3.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
93	-	0.3x3.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
94	-	0.3x2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
95	-	0.5x2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	ND	+
96	-	0.3x3.5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	ND	+
97	-	0.2x2	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	ND	+
98	-	0.5x2.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	269	+
99	-	0.7x2.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	298	+
100	-	0.3x2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	63	+
101	-	0.4x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	2	-	250	+
102	-	0.2x2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	ND	+
103	-	0.3x2.5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
104	-	0.5x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
105	-	0.5x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	ND	+
Cocci																						
106	+	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	ND	-
107	+	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	ND	-
108	+	2.5	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
109	+	2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	+
110	+	2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	2	-	210	-
Nocardioform bacteria																						
111	+	0.3	G	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
112	+	0.3	G	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	+	-	-	ND	+
113	+	0.3	G	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	13	+	-	-	ND	+
114	+	0.3	G	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	6	-	-	-	ND	+
<i>Clostridium</i> sp.																						
115	+	0.5x3.5	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
116	+	0.5x3	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
117	+	0.5x4	+	+	+	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	-

* isolated from the second aeration tanks. G, granules like spores, which did not survive at 60°C for 20 min.
 ND, No data could be obtained.

Table 2-4d(1) The biochemical characteristics of *Bacillus* sp. isolated from D-facility.

No	Gram	Size(μ m)	Spora		Catalase	Motility	Anaerobic growth	Denitri- fication	Me- thyl		Indole	Use of				Hydrolysis		Cooked				
			Sporangium res swollen	res swollen					O	F		NO ₃	NaSH	NH ₃	Amine rich	Starch	Cas- ein	Oil	meat reduced	G- time	Night soil	
<i>Bacillus</i> sp.																						
1	+	0.7x5	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	83	32	+	
2	+	0.7x5	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	87	28	+	
3	+	0.8x5	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	77	45	+	
4	+	0.8x4	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	87	33	+	
5	+	0.7x5	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	82	32	+	
6	+	0.5x5	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	80	29	+	
7	+	0.6x3.5	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	85	37	+	
8	+	0.6x5	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	72	31	+	
9	+	0.6x4	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	79	36	+	
10	+	0.7x4	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	87	33	+	
11	+	0.6x4	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	78	42	+	
12	+	0.6x5	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	82	32	+	
13	+	0.8x3	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	5	+	-	85	42	+	
14	+	1.6x2.5	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	
15	+	0.5x3.5	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	89	+	
16	+	0.7x5	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	72	52	+	
17	+	0.6x3.5	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	9	+	-	75	49	+	
18	+	0.6x3	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	6	+	-	87	42	+	
19	+	0.5x2.5	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	3	-	ND	+		
20	+	0.6x3	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+		
21	+	0.6x3	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+		
22	+	0.4x2	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	531	+	
23	+	0.4x2.5	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	ND	+		
24	+	0.5x3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND	+		
25	+	0.3x3	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	3	-	178	+	
26	+	0.7x2.5	+	-	-	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	+	-	ND	-	
27	+	0.3x2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	202	-		
28	+	1.3x3.5	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	263	+		
29	+	0.3x2.5	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2	-	ND	-	
30	+	0.3x2.5	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	2	-	222	-	
31	+	0.6x4	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	430	+	
32	+	0.3x2.5	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	324	+		
33	+	0.3x2.5	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	ND	+		
34	+	0.3x3	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	+		
35	+	0.7x3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	2	-	390	+
36	+	0.5x2.5	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	529	+	
37	+	0.3x3.5	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	432	+	
38	+	0.6x5	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	2	-	569	+	
39	+	0.5x2.5	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	

ND, No data could be obtained.

Table 2-4d(2) The biochemical characteristics of gram positive-rods isolated from D-facility.

No	Gram	Size(μ m)	Spora		Anaerobic		Denit	Me		Ind	Use of			Hydrolysis		Cooked		G-	Night					
			Spore	ngium	Cata	Moti		robic	rifi		Glucose	thyl	NO ₂	NaSH	NH ₃	Amine	Starch			Cas	meat	Oil	time	soil
			res	swollen	lase	lity	growth	cation	O	F	red	V-P	ole	NO ₂	NaSH	NH ₃	Amine	Starch	Cas	meat	Oil	reduced	%	min
Gram-positive rods																								
40	+	0.7x2.5	G	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	ND	+
41	+	0.3x3.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	3	-	-	ND	-
42	+	0.3x3.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	2	-	-	ND	-
43	+	0.3x3.5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	ND	-
44	+	0.3x3.5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	ND	-
45	+	0.3x3.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	5	-	-	ND	+
46	+	0.3x2.5	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	5	-	-	140	+
47	+	0.3x3.5	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	6	-	-	168	+
48	+	0.3x3.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	3	-	-	ND	-
49	+	0.3x4	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	10	-	-	112	+
50	+	0.3x2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	ND	-
51	+	0.3x2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	222	+
52	+	0.7x2.5	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	4	-	-	ND	+
53	+	0.7x3.5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
54	+	0.3x3.5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	8	-	-	-	-	ND	-
55	+	0.3x3	G	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
56	+	0.3x3	G	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
57	+	0.3-0.4x4	G	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
58	+	0.3x3	G	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	2	-	-	ND	+
59	+	0.3x3	G	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	ND	+
60	+	0.3x2.5	G	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2	-	-	ND	+
61	+	0.3x2.5	G	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
62	+	0.3x2.6	G	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
63	+	0.5x3.5	G	-	-	+	+	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
64	+	0.5x3	G	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
65	+	0.2x2	G	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
66	+	2-2.3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	ND	+
67	+	0.3-0.5	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	2	-	-	ND	+
68	+	0.3x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
69	+	0.2x2	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	ND	-
70	+	0.3x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
71	+	0.3x2.5	-	-	-	+	+	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
72	+	0.3x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	380	+
73	+	0.4x2.5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	455	+
74	+	0.3x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2	-	-	220	+
75	+	0.3x2.5	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	172	+
76	+	0.5x3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	228	+
77	+	0.6x3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	360	-
78	+	0.8x1.5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
79	+	0.5x2.5	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	2	-	-	518	+
80	+	1x2.5	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	76	+
81	+	0.3x2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	88	+
82	+	0.3x2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	381	+
83	+	0.3x2.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
84	+	0.6x3.5	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	431	+
85	+	0.7x2.5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	536	+

* isolated from the second aeration tanks. G, granules like spores, which did not survive at 60°C for 20 min.
 ND, No data could be obtained.

Table 2-4d(3) The biochemical characteristics of gram- negative rods, Cocci, Nocardioform bacteria and *Clostridium* sp. isolated from D-facility.

No	Gram	Size(μm)	Spora		Catalase	Motility	Anaerobic growth	Denitri- fication	Me- thyl		Indole	Use of			Hydrolysis		Cooked		G- time	Night soil
			res	swollen					O	F		NO ₃	NaSH	NH ₃	Amine	Starch	Cas- ein	meat		
Gram-negative rods																				
86	-	0.8x5	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	41	+
87	-	1.8x4	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	6	+	-	-	46	+
88	-	1.3x3.5	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
89	-	0.2x2.5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	415	+
90	-	0.3x3.5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	138	-
91	-	0.5x3.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	524	+
92	-	0.3x3.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	-
93	-	0.3x3.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	-
94	-	0.3x2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	-
95	-	0.5x2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	ND	+
96	-	0.3x3.5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	ND	+
97	-	0.2x2	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	ND	+
98	-	0.5x2.5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	269	+
99	-	0.7x2.5	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	298	+
100	-	0.3x2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	63	+
101	-	0.4x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	2	-	250	+
102	-	0.2x2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	ND	+
103	-	0.3x2.5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	+
104	-	0.5x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
105	-	0.5x2.5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	ND	+
Cocci																				
106	+	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	ND	-
107	+	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	ND	-
108	+	2.5	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	ND	+
109	+	2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND	+
110	+	2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	2	-	210	-
Nocardioform bacteria																				
111	+	0.3	G	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND	+
112	+	0.3	G	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	14	+	-	-	ND	+
113	+	0.3	G	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	13	+	-	-	ND	+
114	+	0.3	G	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	6	-	-	-	ND	+
<i>Clostridium</i> sp.																				
115	+	0.5x3.5	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
116	+	0.5x3	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+
117	+	0.5x4	+	+	+	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	ND	-

* isolated from the second aeration tanks. G, granules like spores, which did not survive at 60°C for 20 min.
 ND, No data could be obtained.

Table 2-5. The ratio of the number of bacteria participating in solubilization of starch, cooked meat and fats(Tween 80), and in decomposition use of hydrogen sulfide, ammonia and triethyl amine(%).

substrate	Facilities	Inachuo average	A		B	C	D
	Bacteria		I	II			
Starch	<i>Bacillus</i> sp.	10	26	24	2	21	2
	Gram-positive rods	1	0	3	0	3	1
	Gram-negative rods	0	0	0	0	0	1
	Cocci	0,2	0	0	-	0	0
	Nocardioform bacteria	13	-	-	-	-	7
Cooked meat	<i>Bacillus</i> sp.	28	48	47	22	21	9
	Gram-positive rods	2	0	0	0	0	0
	Gram-negative rods	0	0	0	0	0	0
	Nocardioform bacteria	1	-	-	-	-	0
Tween80/ Soybean oil	<i>Bacillus</i> sp.	42	4	5	2	5	4
	Gram-positive rods	9	2	7	0	6	17
	Gram-negative rods	3	1	1	0	3	1
	Cocci	1	0	0	-	6	1
	Nocardioform bacteria	11	-	-	-	-	0
H ₂ S	<i>Bacillus</i> sp.	38	6	5	5	26	12
	Gram-positive rods	5	2	10	12	34	8
	Gram-negative rods	3	2	1	2	3	7
	Cocci	1	5	0	-	3	2
	Nocardioform bacteria	6	-	-	-	-	2
NH ₃	<i>Bacillus</i> sp.	29	53	51	13	34	14
	Gram-positive rods	1	3	10	36	29	23
	Gram-negative rods	1	6	5	2	0	4
	Cocci	0,2	2	0	-	8	1
	Nocardioform bacteria	8	-	-	-	-	2
Triethyl amine	<i>Bacillus</i> sp.	44	5	5	21	31	3
	Gram-positive rods	3	4	1	33	26	8
	Gram-negative rods	4	0	2	5	0	3
	Cocci	0,4	0	0	-	8	1
	Nocardioform bacteria	9	-	-	-	-	0
Denitrifi- cation	<i>Bacillus</i> sp.	10	4	3	6	5	3
	Gram-positive rods	7	2	7	3	5	8
	Gram-negative rods	1	0	0	0	1	4
	Nocardioform bacteria	0	-	-	-	0	2

I, the first aerobic digestion tank. II, the second aerobic digestion tank.
-, did not detected

Table 2-6. The effects of inorganic ions on the growth of *Bacillus* sp. in each facilities.

Facilities	Strains No	OD of stationary phase			Generation time			Filament		
		Control	Mg ²⁺	Mg ²⁺ +Si	Control	Mg ²⁺	Mg ²⁺ +Si	Control	Mg ²⁺	Mg ²⁺ +Si
A	1	1.05	1.18	1.26	36 (2.5)	46 (4.0)	37 (4.5)	+	-	-
	2	1.01	1.01	1.17	40 (3.0)	35 (4.0)	43 (5.0)	+	-	-
	3	1.03	1.14	1.07	37 (2.5)	33 (4.0)	43 (4.0)	+	-	-
B	1	1.03	1.19	1.27	32 (3.5)	40 (4.0)	33 (5.5)	+	-	-
	2	1.14	1.33	1.28	25 (3.0)	27 (5.0)	32 (5.5)	+	-	-
C	1	1.00	1.07	ND	30 (3.0)	42 (5.0)	ND	+	-	ND
	2	1.06	1.25	ND	35 (3.5)	30 (4.5)	ND	+	-	ND
D	1	1.07	1.09	1.09	32 (3.0)	32 (4.0)	36 (4.0)	+	-	-
	4	1.05	1.06	1.13	33 (3.0)	43 (5.0)	34 (4.0)	+	-	-

(), period (hr) of exponential phase

Table 2-7 The identification of strains of *Bacillus* sp. and Nocardioform bacteria.

Facilities	<i>Bacillus</i> Strains	Parasporal crystals	Growth at 50°C	Growth in 7% NaCl	GC-contents(%)	Identification
A	1	-	+	+	42	<i>B.licheniformis</i>
	2	-	+	+	41	unidentified
	3	-	+	+	43	unidentified
	4	-	+	+	41	unidentified
	5	-	+	+	44	<i>B.licheniformis</i>
	6	-	+	+	43	<i>B.licheniformis</i>
	7	-	+	+	45	<i>B.subtilis</i>
	9	-	+	+	42	<i>B.subtilis</i>
	11	-	+	+	39	unidentified
	21	-	-	+	42	<i>B.subtilis</i>
B	1	-	+	+	43	<i>B.pumilus</i>
	2	-	+	+	45	<i>B.pumilus</i>
C	1	-	+	+	47	<i>B.licheniformis</i>
	2	-	+	+	43	<i>B.licheniformis</i>
	3	-	+	+	46	<i>B.licheniformis</i>
	7	-	+	+	45	<i>B.licheniformis</i>
	8	-	+	+	45	<i>B.licheniformis</i>
	9	-	+	+	47	<i>B.licheniformis</i>
D	1	-	+	+	42	<i>B.pumilus</i>
	4	-	+	+	47	<i>B.pumilus</i>
	6	-	+	+	42	<i>B.pumilus</i>
	7	-	+	+	43	<i>B.licheniformis</i>
	9	-	+	+	45	<i>B.pumilus</i>
	12	-	+	+	47	<i>B.licheniformis</i>
Nocardioform bacteria						
D	112				72	<i>Oerskovia turbata</i>
	113				69	<i>O.turbata</i>
	114				69	<i>O.turbata</i>

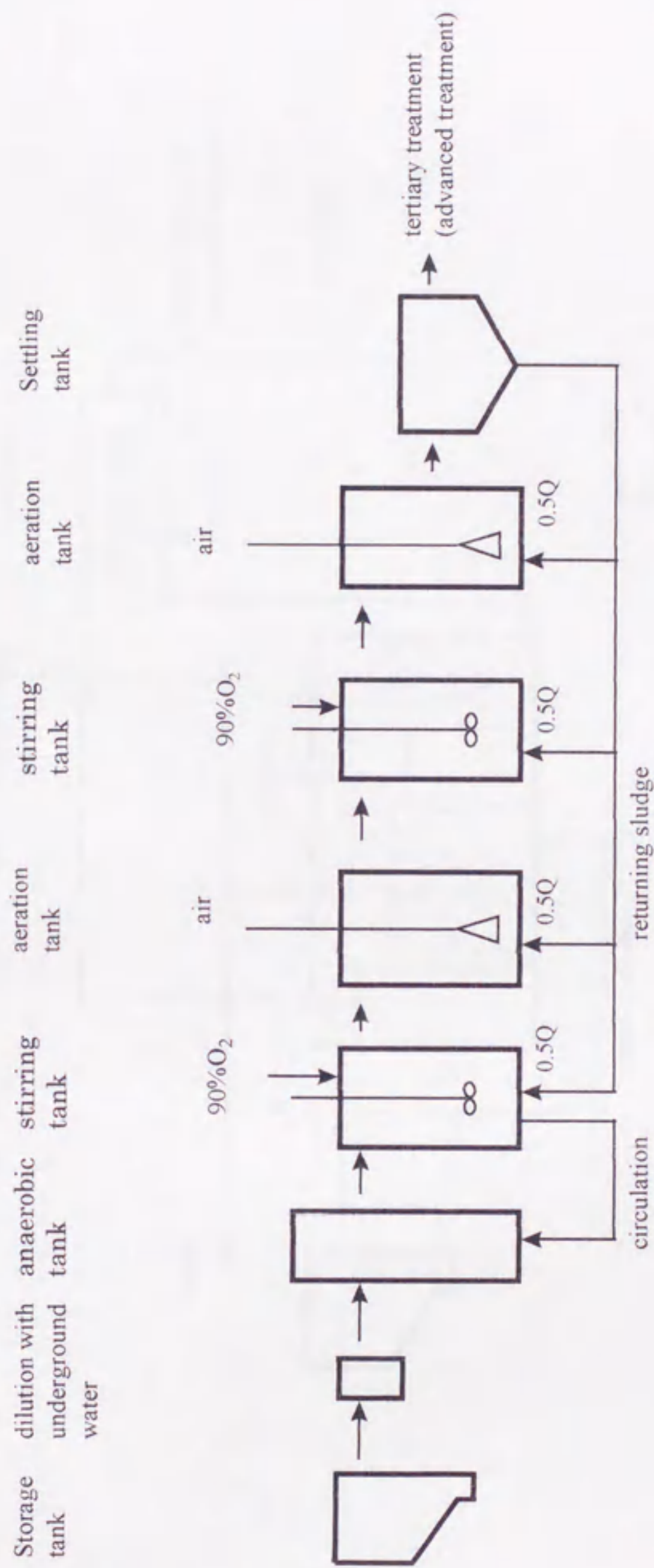


Fig. 2-1(a). Aerobic Oxidation night soil treatment process at A- facility.

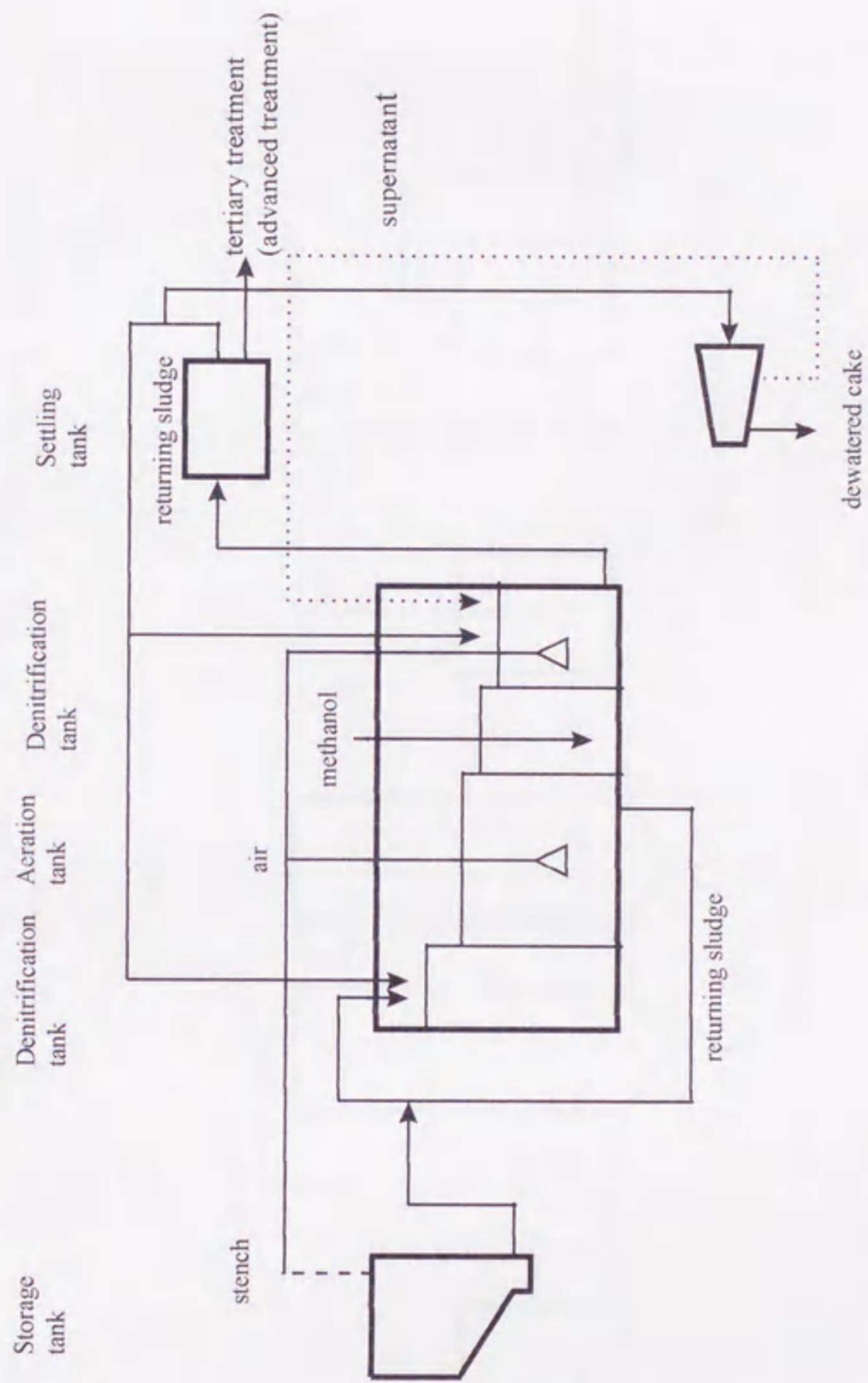


Fig2-1(b). Anoxic Denitrification night soil treatment process at B-facility

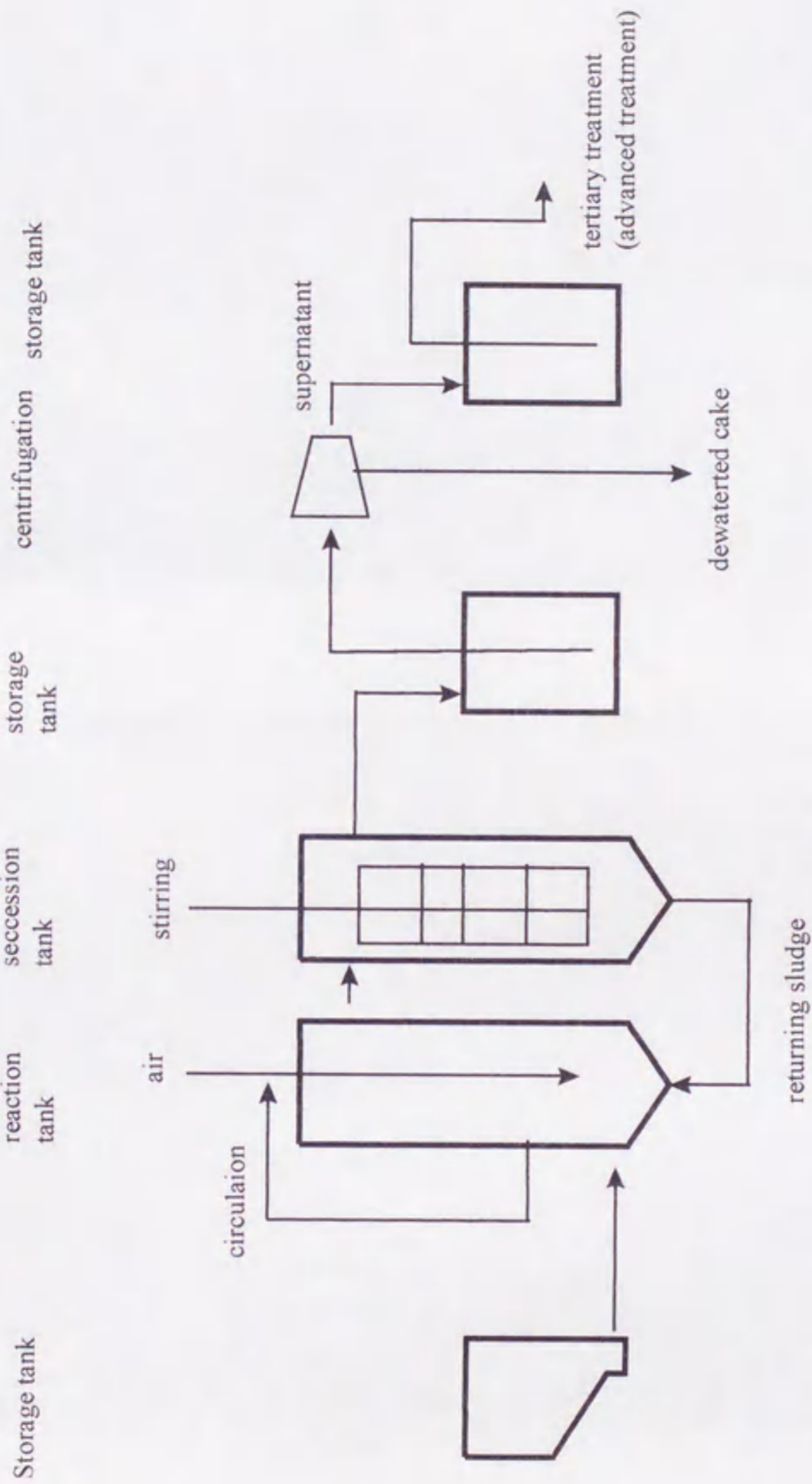
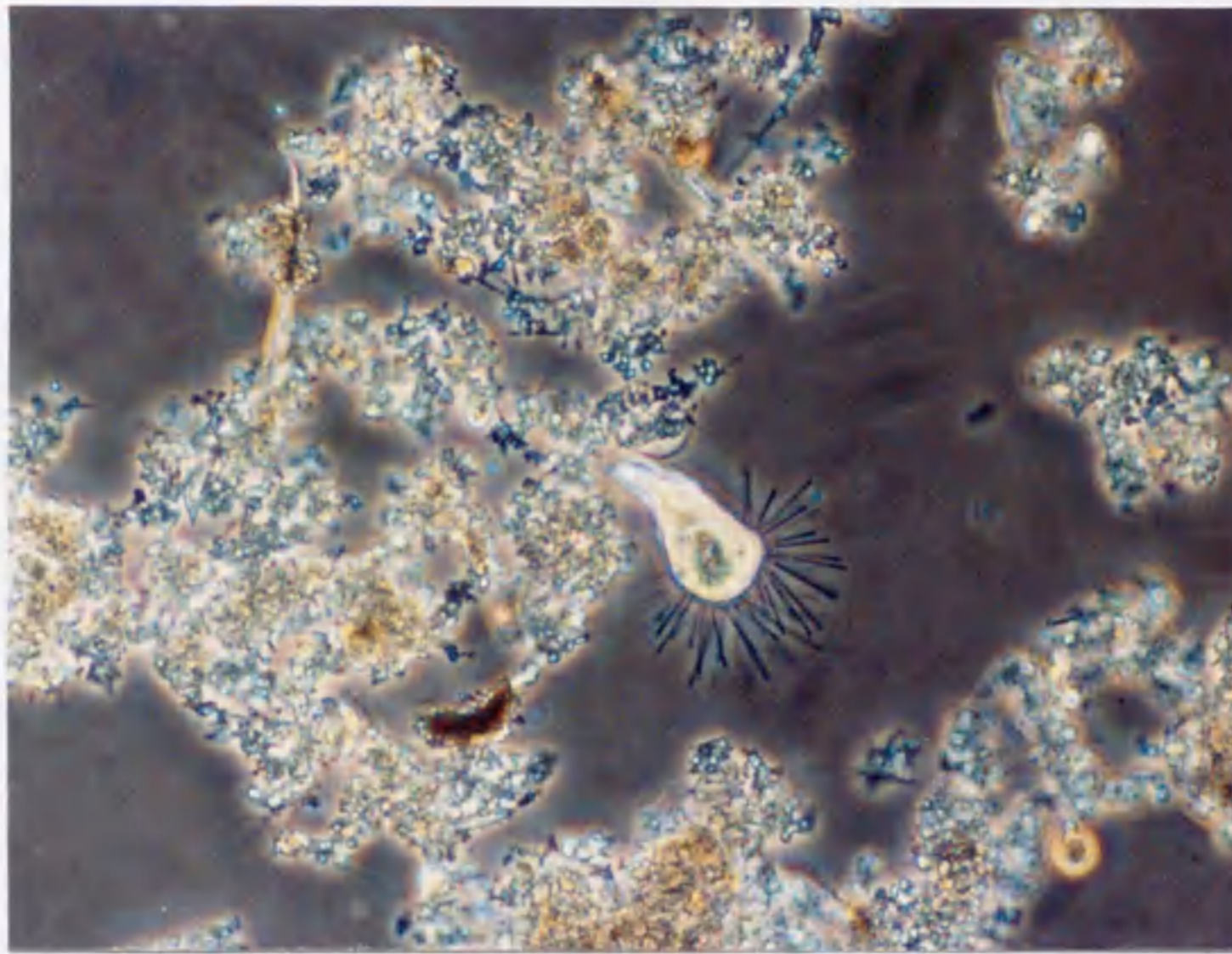
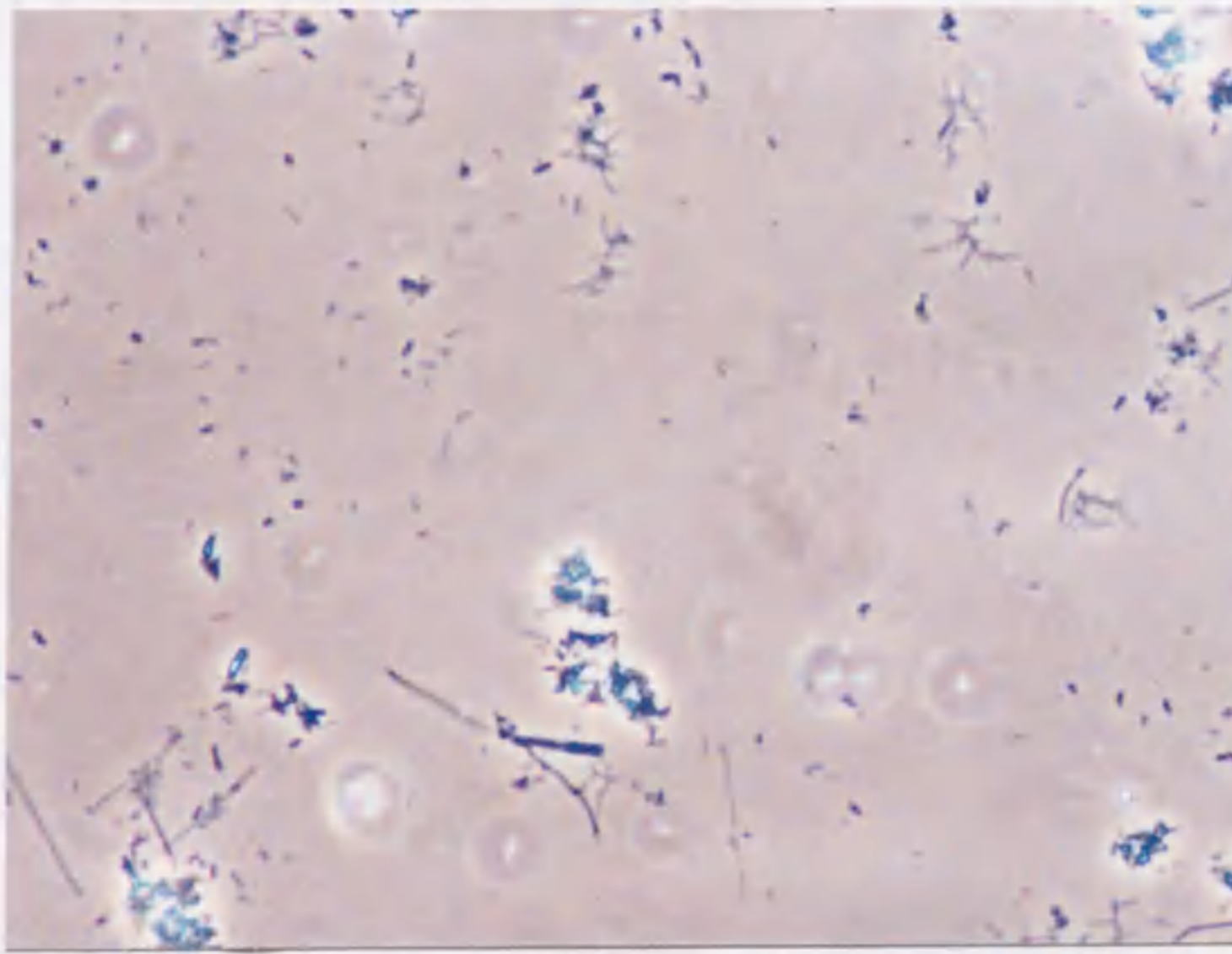


Fig.2-1(c). Single Batch Reactor night soil treatment process at D-facility.



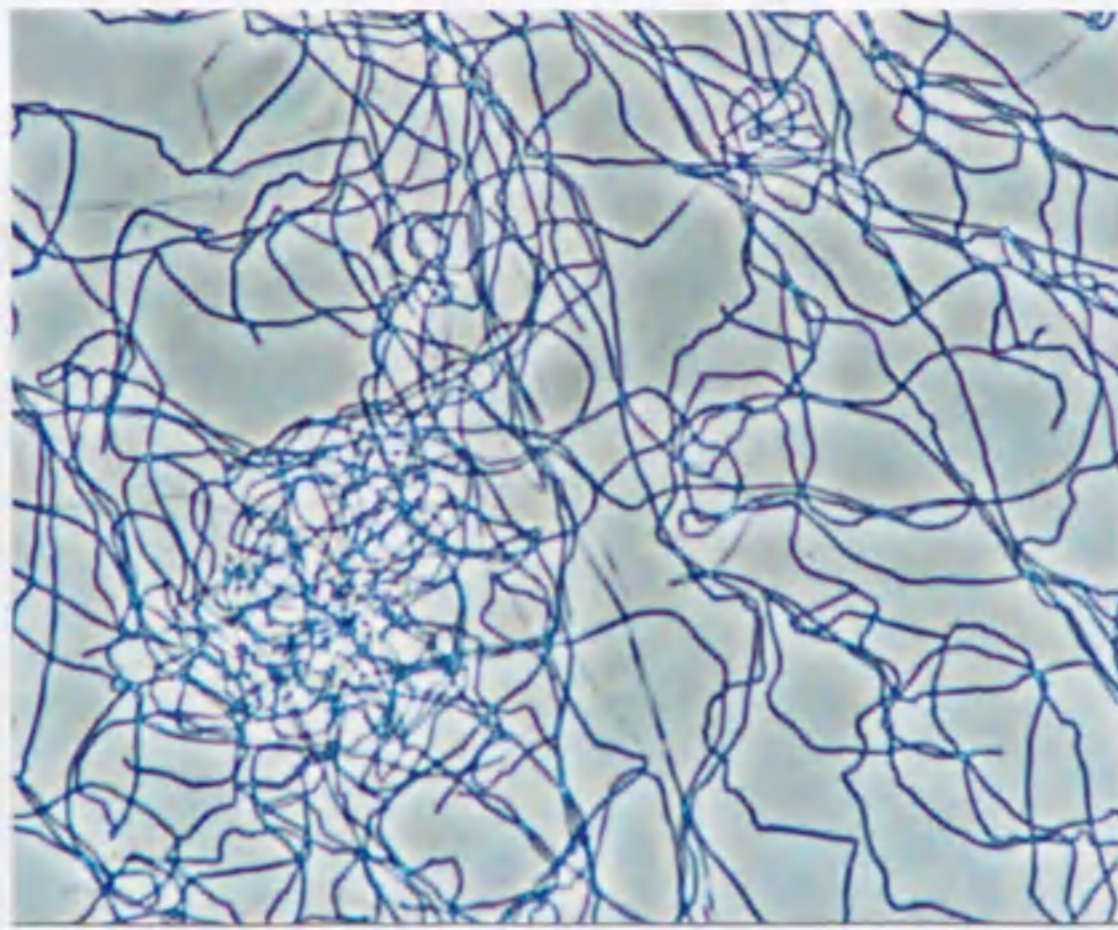
A



B

Fig.2-2. The photographs of the treatment water suspension of night soil
In the treatment tank at D-facility($\times 600$).

A: Inachuo (formation of flocks); B: D-facility (no flocks)



A

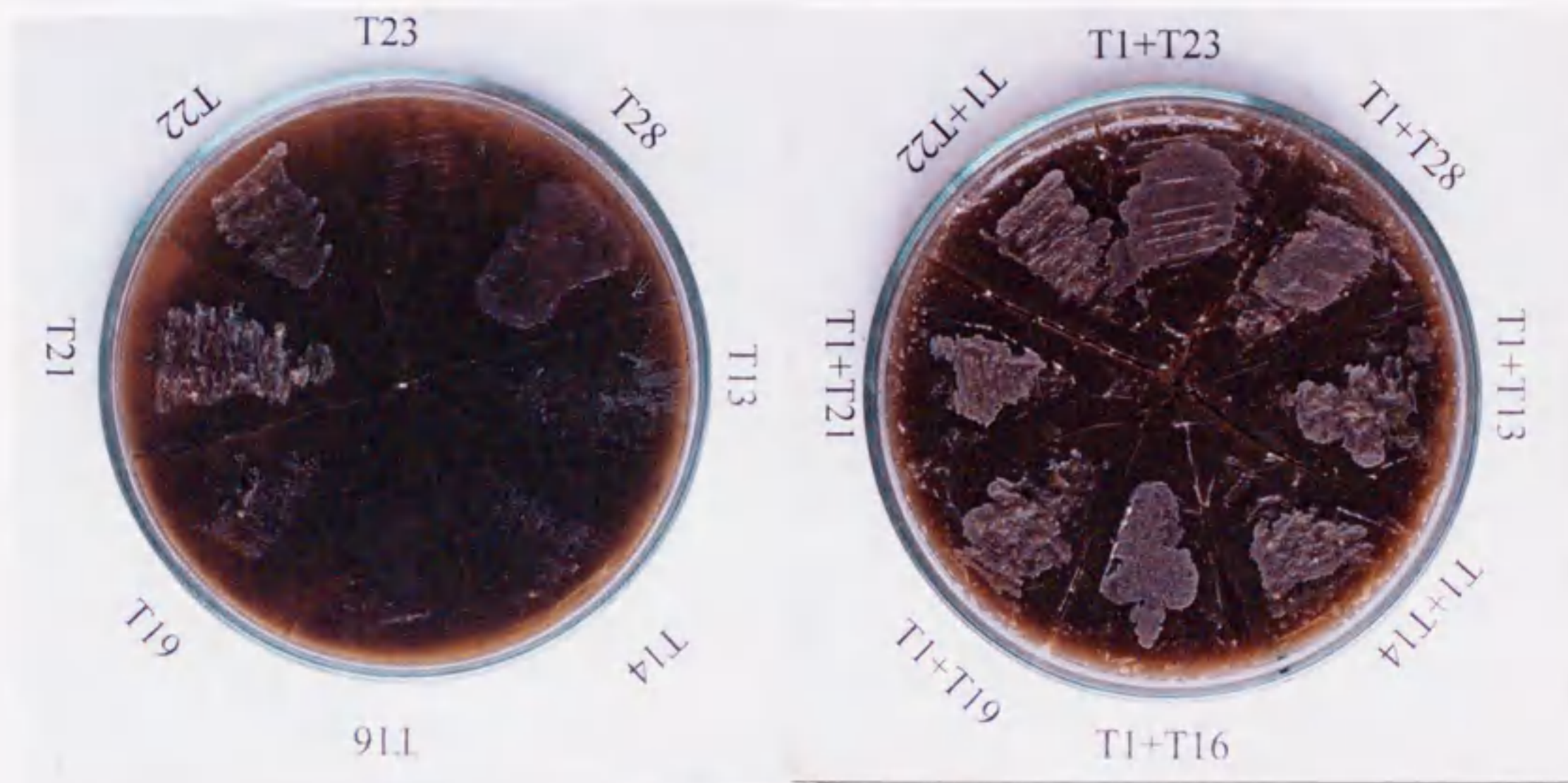


B



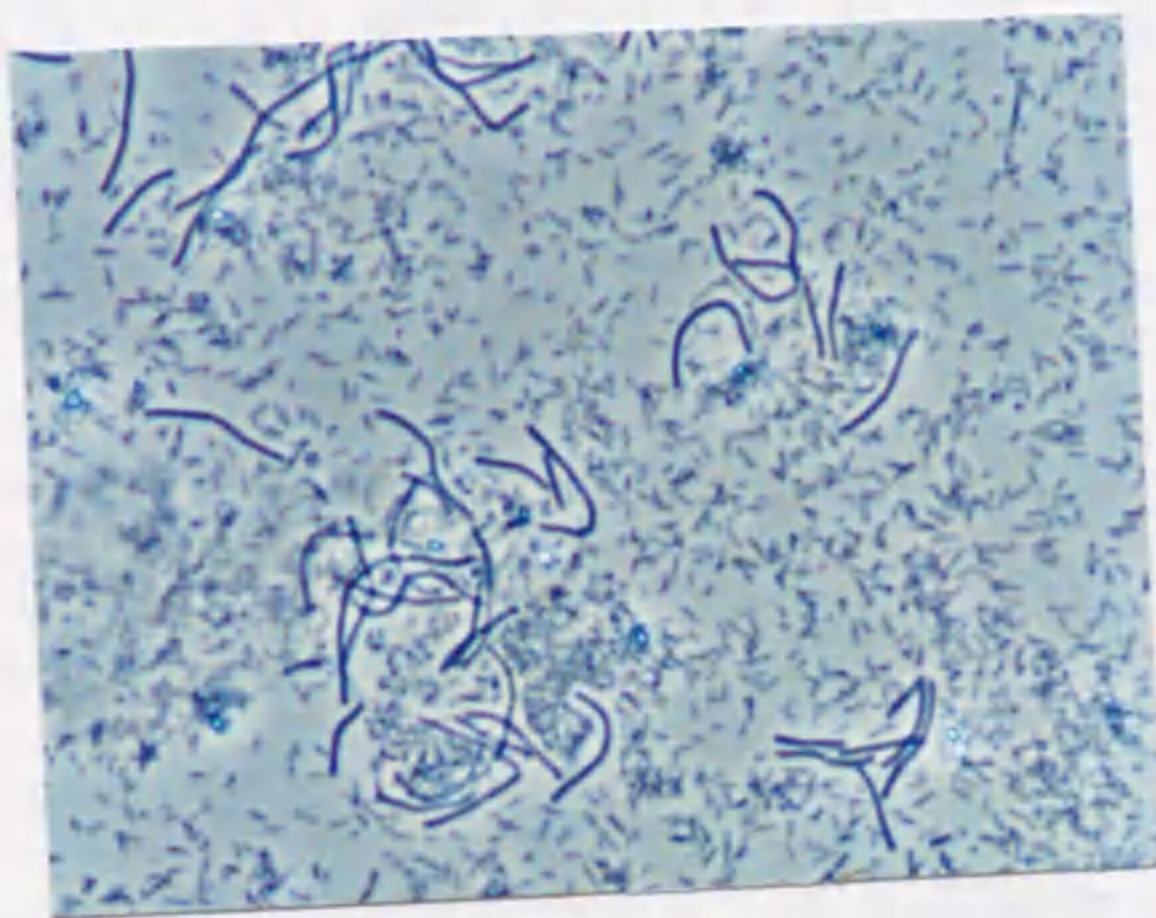
C

Fig.2-3. The change of the morphological view of *Bacillus* sp. (A-facility; strain 2) after 8 hours culture at 32°C.
A : without addition of Mg ion and silicic acid
B: in presence of Mg²⁺ (5mg/l)
C: in presence of Mg²⁺ (5mg/l) and Si(10mg/l)



A T; isolated from C-facility

B



C

Fig .2-4. The growth of bacteria on Night soil containing agar .
 A: pure culture; B: mixing culture
 C: bacteria strain No: T-1 was multiplied
 by mixing of strain No:T-23.

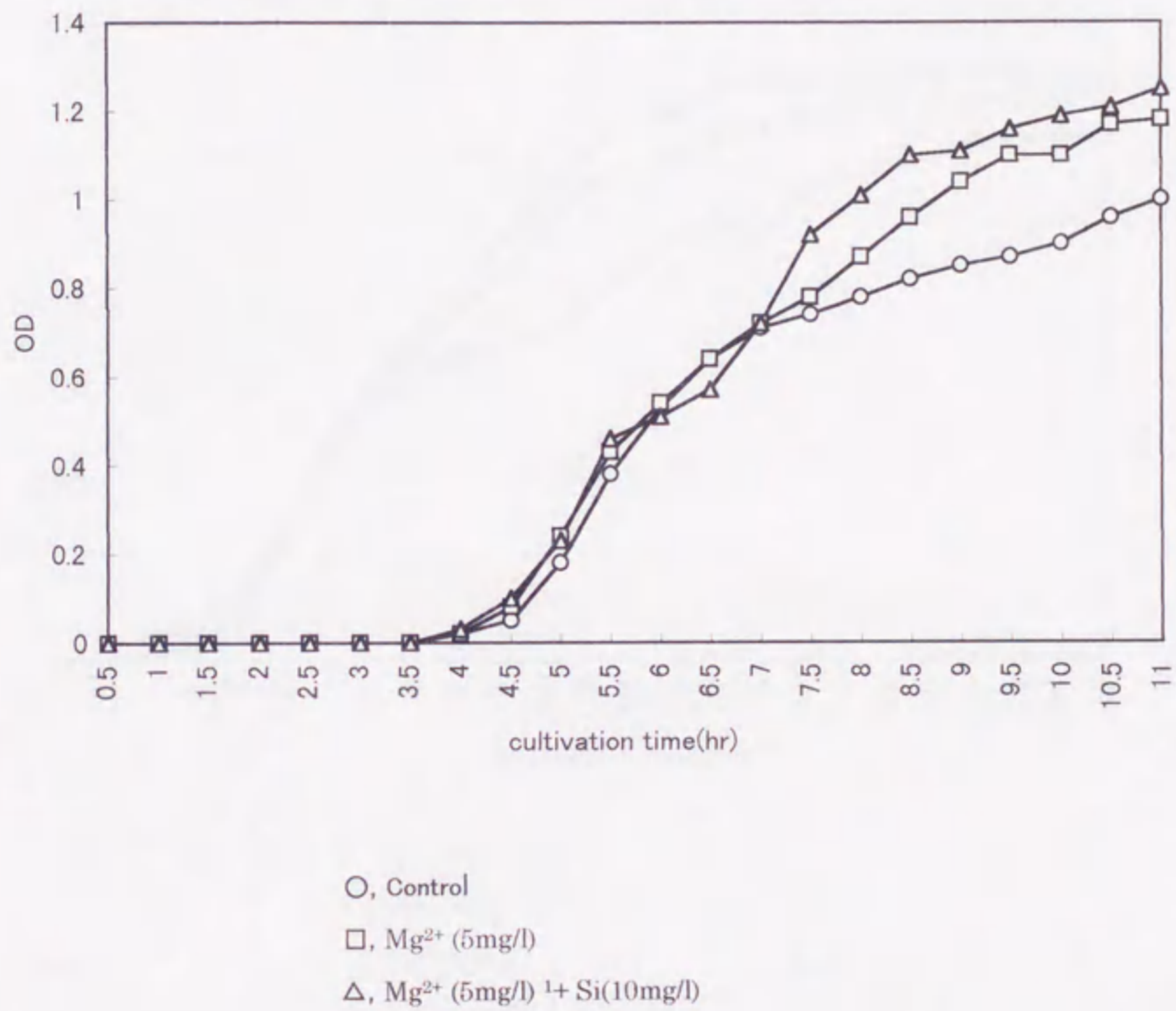


Fig. 2-5(a). The growth curves of *Bacillus* sp.(A-facility, strain 1) by addition of Mg Ion and Silicic acid.

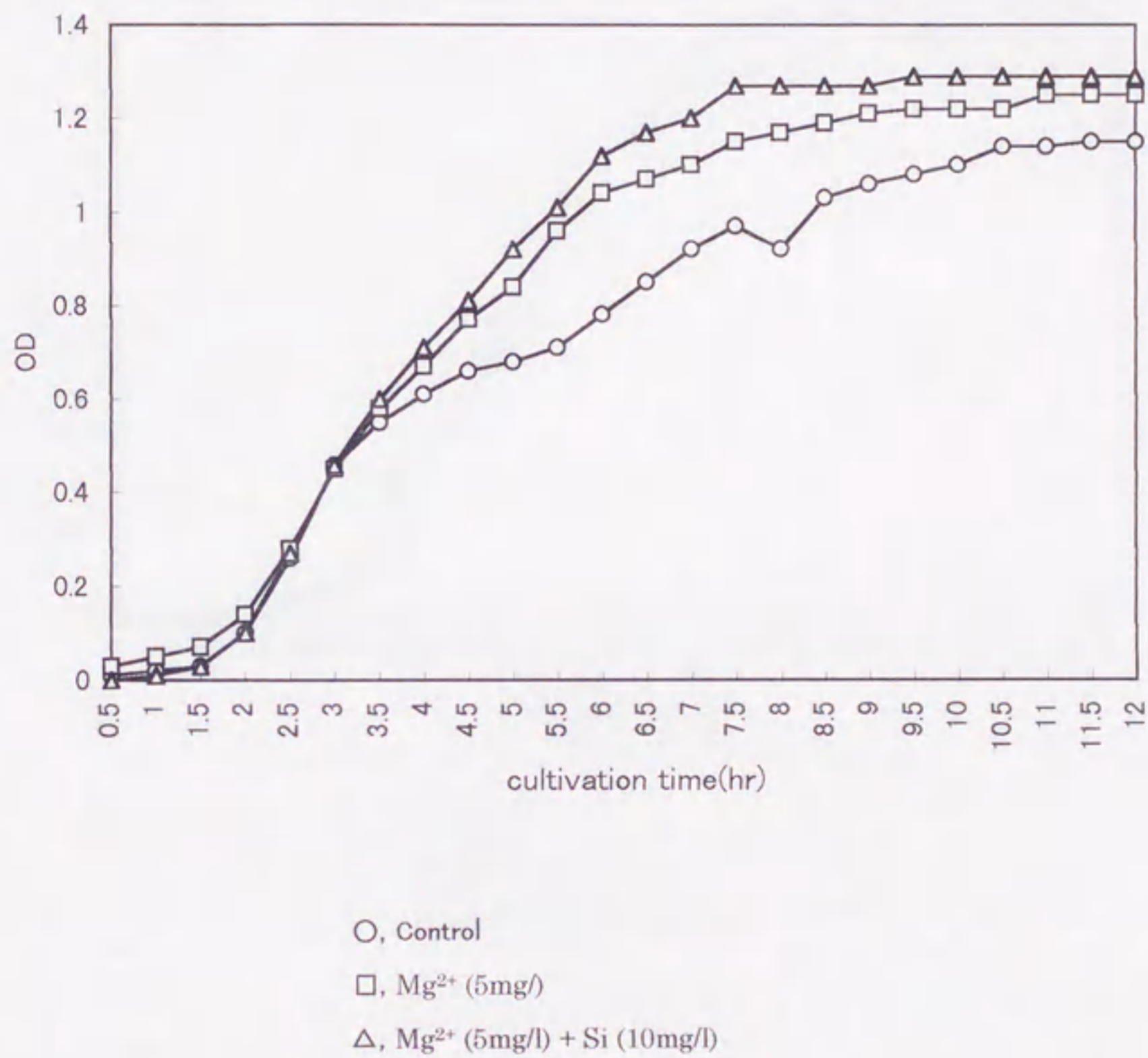


Fig. 2-5(b). The growth curves of *Bacillus* sp.(B-facility, strain 1) by addition of Mg Ion and Silicic acid.

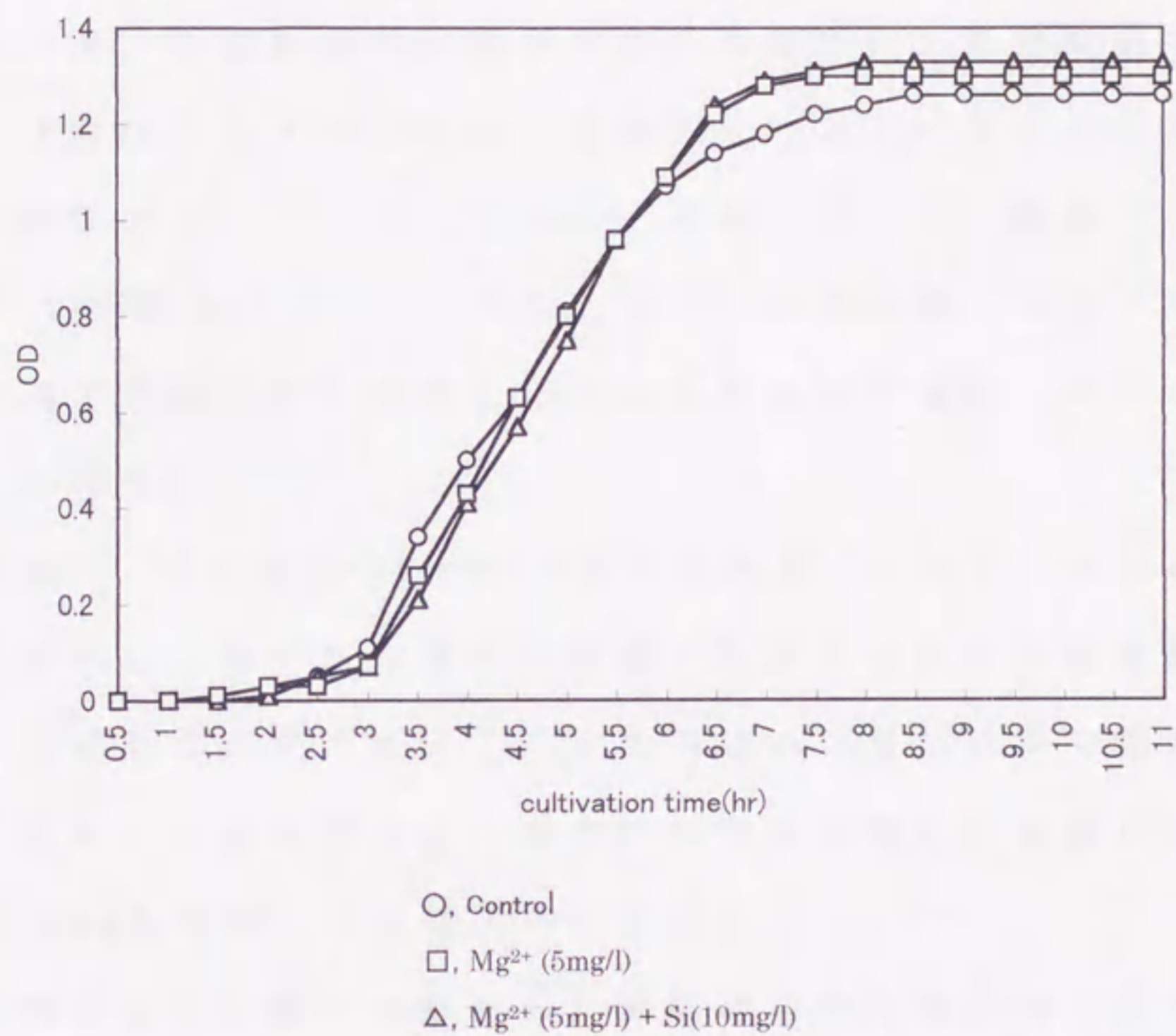


Fig. 2-5(c). The growth curves of *Bacillus* sp.(D-facility, strain 1) by addition of Mg Ion and Silicic acid.

第3章 総括と今後の展望

活性汚泥法は自然界の微生物の浄化作用を人工装置化した汚水処理方法である。この方法は本来 BOD 指標とする有機物質除去を目的として開発された。その後、処理を改善するため、酸素供給量、高濃度活性汚泥法などが研究され、処理時間の短縮および容積当たりの処理量の増加を目的としてさまざまな変法が研究開発されてきた。さらに、窒素、燐の除去機能を付加したプロセスが開発された。しかし、近年、生物処理工程における細菌に関する研究報告がなく、その処理機構の解明に関する研究は見られない。

村上ら⁷⁾⁸⁾では 1991 年に伊那中央衛生センター好気性消化槽の細菌を解析し、無臭且つ効率的処理に関与する活性汚泥細菌相を明らかにした。その後、これらの細菌の性質に応じて施設の運転を行い、し尿の無臭且つ効率的処理は恒常的に実施可能となり、1994 年処理がより効率的になった。

本研究は、伊那中央衛生センター消化槽の優占細菌相の変化および処理の効率化の要因を解明し、また、その他の施設の優占細菌の構成とその分解能を解析し、処理との関連性を明らかにした。

第1章では、し尿処理状態がより改善された優占細菌相の構成とその生化学的性質を解析し、次の事実が明らかになった。

伊那中央衛生センター処理場は第1槽と第4槽の流出水とも約 $10^8 \sim 10^9 \text{ cfu/ml}$ のコロニーを検出した。優占細菌相は *Bacillus* sp. が 43～77%、ノカルシア型細菌が 5～18%、グラム陽性桿菌が約 12～27%、グ

グラム陰性桿菌が約2~16%、球菌が2%であった。その内、*Bacillus* sp.および*Oerskovia* sp.が最高95%を占めた。*Bacillus* sp.は*B. pumilus*、*B. subtilis*、*B. schlegelii*、*B. cereus*、*B. megaterium*、*B. thuringiensis*からなり、*Oerskovia* sp.は*O. turbata*であった。1991年には*B. thuringiensis*および*B. pumilus*はそれぞれ46%、42%を占めていたが、1994年では*B. thuringiensis*が約1.4%まで減少し、*B. schlegelii*、*B. subtilis*、*O. turbata*およびグラム陽性桿菌が増加し、細菌相の構成が大幅に変化した。1991年に単離した*B. thuringiensis*は澱粉、脂質、硫化水素およびアンモニアの分解性資化性を担っていた。1994年では*O. turbata*と*B. subtilis*は炭水化物の分解資化に関与し、*O. turbata*、*B. schlegelii*およびグラム陽性桿菌は油脂の分解を担っていた。澱粉、脂質に関係した優占細菌相は多様化し、分解能力も1991年より優れていた。蛋白質分解性に関係した*B. pumilus*の分解能がより強くなっていた。このような変化によって処理能が大幅に高まったと考えられた。なお、菌体濃度を高濃度維持するためには、曝気量と汚泥返送量の制御に加えてMg²⁺とSiの添加が必要であることを再確認した。

第2章では、し尿処理施設4ヶ所の活性汚泥細菌を解析し、伊那中央衛生センターと比較した。各施設の優占細菌相の割合および分解・資化性と汚泥生成率との関係について考察した。この結果から、各施設の活性汚泥細菌の性質と処理結果との間に明確な関連性が見られた。

伊那中央衛生センター並びに4ヶ所のし尿処理施設の汚泥生成率を調べた結果、伊那中央衛生センター3.3%、D施設5.7%、C施設7.8%、B施設39%、A施設90%であった。

長時間処理方式における処理槽の総細菌数は $10^8 \sim 10^9 \text{ cfu/ml}$ で細菌数に大きな差は見られなかった。SBR方式では細菌数が多く $10^{10} \sim 10^{11} \text{ cfu/ml}$ であり、処理に関係した細菌数と処理時間は長時間処理方式の場合とほぼ反比例の関係にあることが判明した。優占細菌は *Bacillus sp.*、グラム陽性桿菌、グラム陰性桿菌、球菌、ノカルシア型細菌、*Clostridium sp.*によって構成されていた。何れの施設にも *Bacillus sp.*が高い割合で占めていたが、ノカルシア型細菌はD施設以外から単離されなかった。

汚泥生成率の高い施設では澱粉および蛋白質分解性細菌数の割合が高くても、油脂分解性細菌数が少ない事(13%以下)が判った。また、汚泥生成率の低い施設では澱粉、蛋白質および油脂分解性細菌数の割合が高かった(20%以上)。悪臭の発生は、澱粉分解性細菌数と油脂分解性細菌数が少ない場合に見られることを示唆した。また、*Bacillus sp.*およびノカルシア型細菌が優占した細菌相の方が安定した処理に有利であることを再確認した。単離細菌は単独でし尿寒天培地で生育性を示し、し尿の処理に関わっていることを示した。また、金属イオンの添加に及ぼす生育の影響試験の結果から Mg^{2+} または $\text{Mg}^{2+} + \text{Si}$ の添加は *Bacillus sp.*の世代時間の短縮、菌体濃度の増加およびフィラメント形成を阻害する効果を再確認した。単離したクワクトミート分解性菌株が *B.licheniformis*、*B.pumilus*、*B.subtilis*であることを明らかに

した。同時に、伊那中央衛生センターの消化槽から単離したクックトミート分解性の *B.pumilus* や *B.subtilis* のアンモニア利用性が *B.licheniformis* の性質と関係していることを明らかにした。D施設から単離したカルジウム型細菌は *O.turbata* と同定した。

このように Mg^{2+} と Si の添加および返送量の増加によって、関与細菌が優占的に増殖され、処理効率を上げることに貢献することが可能であった。伊那中央衛生センターの運転方法を生かし、処理に関与する細菌の増殖に好都合な栄養状態が整えられ、菌体が高濃度に保たれ効率的且つ無臭し尿処理が可能になるものと考えられる。現在、下水処理においては有機性不溶性成分が細菌によって分解されないとされているが、蛋白質・炭水化物・油脂分解性の強い活性汚泥細菌の増加によって生物性 SS 成分が活性汚泥によって分解される可能性が考えられ、下水処理においても無臭処理が実現する可能性が示唆される。

今後の課題として伊那中央衛生センターの脱窒機構の解明が必要である。また、単離したクックトミート分解性を示す *B.pumilus* は *B.licheniformis* の性質を有することを DNA レベルで確認する必要がある。また、一般にクックトミート可溶化能を示さない *B.schlegelii* 1 株と *O.turbata* 1 株がクックトミート可溶化能を示したことは興味ある現象であり、今後のこのグループの生化学的性質の変化の追跡が重要な課題である。

現在、伊那中央衛生センターのし尿処理はさらに改善されている。今後、定期的にこの細菌相の変化を解明することは好気性無臭し尿処理に関与する活性汚泥細菌相を解明する上で重要な課題

であり、さらに効率的処理が可能な細菌相の解析が可能となると考えられる。

なお、し尿処理の生物処理工程に関することであって、し尿処理における効率性の解析にはここに明らかにした事実以外に、汚泥沈降性や脱水性等種々の角度から考察する必要があると考えられる。

本研究で得られた排水処理機構に関する見解はこれまで知られていない。ここで得られた知見が下水処理にも見られるか否か興味ある課題である。今後、これらの点について検討を進めることを望まれる。

謝辞

本研究および論文作成にあたり、御指導御助言頂きました信州大学農学部入江鎌三教授に厚くお礼申し上げます。

また、細菌の生態学的実験を遂行するに当り御指導して頂いた信州大学農学部田端信一郎助教授、DNAの抽出にお世話になった信州大学農学部建石耕一教授、Biolog社 Microlog™ Systemで菌株の同定を行って頂いた梅村由香氏（グンゼ産業）に感謝致します。

この研究にご協力頂いた伊那中央衛生センターの村上弘毅氏（伊那衛生センター所長）および職員の青木 満氏、汚泥並びに各種資料を提供して頂いた北原敏行氏（塩尻衛生センター所長）、酒井勝氏（塩尻衛生センター係長）、小林弘志氏（伊南衛生センター所長）、松崎伸一氏（伊南衛生センター係長）、清水保秀氏（南部衛生センター係長）、五城目衛生センター関係者および各衛生センター職員各位に感謝致します。

最後に、奨学金を支給していただいた日本国文部省、米山ロータリ奨学会および佐川奨学会の皆様、日頃大変お世話になった荻原昭先生、そして生態解析化学研究室の皆様に対して、心から感謝致します。

引用文献

- 1) Krieg, N. R. and Holt, J. G.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th Ed., Vol 1 (ed. by Unz, R. F.), 214-219, Williams and Wilkins (1984), Baltimore.
- 2) Staley, J. T., Bryant, M. P. and Pfenning, N.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th Ed., Vol 3 (ed. by Mulder, E. G.), 1994-1998, Williams and Wilkins (1989), Baltimore.
- 3) Staley, J. T., Bryant, M. P. and Pfenning, N.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th Ed., Vol 3 (ed. by Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H-P. and Hooper, A. B.), 1808-1834, Williams and Wilkins (1989), Baltimore.
- 4) Staley, J. T., Bryant, M. P. and Pfenning, N.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th Ed., Vol 3, Williams and Wilkins (1989), Baltimore. 1842-1858, *Thiobacillus* sp. (ed. by Kelly, D. P. and Harrison, A. P.), 1858-1861, *Thiomicrospira* sp. (ed. by Kuenen, J. D. and Robertson, L. A.), 1963-1968, *Blastobacter* sp. (ed. by Trotsenko, Y. A., Doronina, N. V. and Hirsh, P.), 2219-2224, Halobacterium (ed. by Larsen, H. and Grant, W. G.)等 denitrificans の項参照.
- 5) R. E. McKinney and R. G. Weichlein : Appl. Microbiol., 1, 259, 1953.
- 6) L. Jasewicz and N. Porges: Sewage Ind. Wastes, 28, 1130, 1956.

- 7) 村上弘毅・土井幸夫・青木満・入江鎌三：好気性し尿処理槽における *Bacillus* sp. の優占化とそれらの生化学的性質、水環境学会誌、18巻、97-108 (1995)。
- 8) 土井幸夫・村上弘毅・青木満・入江鎌三・建石耕一：好気性無臭し尿処理において優占する *Bacillus* sp. に対する金属イオンの影響、日本水処理生物学会誌、32、111-121 (1996)。
- 9) 村上弘毅、李文生、土井幸夫、青木満、入江鎌三、建石耕一：好気性無臭し尿処理において優占化する *Bacillus* sp. の種の同定、日本水処理生物学会誌、32、105-110 (1996)。
- 10) 長谷川武治編：微生物の分類と同定、下(改訂版)、99~160、学会出版センター(1985)、東京。
- 11) Sneath, P. H. A., Mair, N. S. and Sharpe, M. E.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th Ed., Vol 2, ed. by Sneath P. H. A., 1104~1139, Williams & Wilkins (1986), Baltimore.
- 12) 坂崎利一、吉崎悦郎、三木寛二：新細菌培地学講座-下1、第2版、4~150、近代出版(1988)、東京。
- 13) Sneath, P. H. A., Mair, N. S. and Sharpe, M.E.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th Ed., Vol.2, ed. by Sneath, P. H. A., 1458~1506, Williams & Wilkins(1986), Baltimore.
- 14) Williams. S. T. and Sharpe. M. E.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th Ed., Vol 4, by ed. Lechevalier, H. A., 2348-2404, Williams & Wilkins (1989), Baltimore.

- 15) Balowa, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. : The Prokaryotes, 2nd ed., Vol II (ed. By Slepecky, R. A., Hemphill, H. E., Stahly, D. P., Andrew, R. E., Yousten, A. A., Farrar, W. E. and Beroli, A. C.), 1663-1768, Springer-Verlag(1992), New York.
- 16) Balowa, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. : The Prokaryotes, 2nd ed., Vol II(ed. By Goodfellow, M.), 1188-1213, Springer-Verlag(1992), New York.
- 17) Balowa, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. : The Prokaryotes, 2nd ed., Vol II (ed. by Stackebrandt, E and Prauser, H), 1323-1345, Springer-Verlag (1992), New York.
- 18) Doi, R. H. and McGloughlin, M.: Biology of Bacilli-Applications to Industries, Butterworth-Heinmann, Boston, 10-11, 1992.
- 19) 日本化学会編：新実験化学講座、生物化学－II（三浦謹一郎著）、丸善、20巻、637-670、東京（1978）。
- 20) 藪内英子編：新しい分類学に伴走する細菌同定法、鈴木健一郎、江崎孝行、朴勇河著、菜根出版、東京、88-95（1987）。
- 21) 中西弘：し尿処理、水質汚濁研究、14、766-771(1991)。
- 22) 大竹千代子編(1978) 日本環境図譜、pp.231-233、共立出版東京。
- 23) 光岡知足(1978)腸内細菌の話、岩波書店、東京。

- 24) Dugan, P. R. (鈴木静夫、鈴木潤三、多田史 訳) (1973)水質汚染の生態学、pp.72-82、東京化学同人。
- 25) Komagata, K., H. H. Iizuka and M. Takahashi: *J. Gen. Appl. microbiol.*, 11, 191 (1965).
- 26) Sneath, P. H. A., Mair, N. S. and Sharpe, M. E. : *Bergey's Manuals of Systematic Bacteriology* (Ed. H. A. Lechevalier), Williams & Wilkins, 9th Ed., Vol 2, 1458-1506, Baltimore, U.S.A (1986).
- 27) Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. : *Bergey's Manuals of Systematic Bacteriology* (Ed. H. A. Lechevalier), Williams & Wilkins, Vol 4, 2348-2401, Baltimore, U.S.A (1989).
- 28) Balowa, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. : *The Prokaryotes*, (Ed. R. A. Slepecky, H. E. Hemphill, D. P. Stahly, R. E. Andrew, A. A. Yousten, W. E. Farrar and A. C. Beroli), Springer-Verlag, Vol 2, 1329-1334, New York, U.S.A (1992).
- 29) Sneath, P.H.A., Mair, N. S. and Sharpe, M. E. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Ed. P.H.A. Sneath), 9th Ed., Vol 2, Williams & Wilkins, 1104-1139, Baltimore, U.S.A (1986).
- 30) Balowa, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. : *The Prokaryotes*, (Ed. R. A. Slepecky, H. E. Hemphill, D. P. Stahly, R. E. Andrew, A. A. Yousten, W. E.

- Farrar and A. C. Beroli), Springer-Verlag, Vol 2, 1663-1768, New York, U.S.A (1992).
- 31) Sneath, P.H.A., Mair, N. S. and Sharpe, M. E. : Bergey's Manuals of Systematic Bacteriology (Ed. E. P. Kato, W. L. George and S. M. Finegold), Williams & Wilkins, 9th Ed., Vol2, 1141-1200, Baltimore, U.S.A (1986).
- 32) Balowa, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. : The Prokaryotes, (Ed. H. Hippe, J. R. Andreesen, G. Gottschalk and L. D.S. Smith), Second ed., Springer-Verlag, Vol 2, 1800-1878, New York, U.S.A (1992).
- 33) Sneath, P. H. A., Mair, N. S. and Sharpe, M. E. : Bergey's Manuals of Systematic Bacteriology (Ed. K. H. Schleifer), Williams & Wilkins, 9th Ed., Vol 2, 999-1103, Baltimore, U.S.A (1986).
- 34) 李文生、青木満、入江録三、村上弘毅、建石耕一：好気性無臭し尿処理に優占する細菌の変化、日本水処理生物学会誌、32、93-104 (1996)。
- 35) 李文生、青木満、入江録三、田端信一郎、村上弘毅、建石耕一：好気性無臭し尿処理において優占化を維持する *Bacillus* sp. と *Oerskovia* sp. の種の同定、防菌防黴、24、709-717(1996)。
- 36) Balowa, A., Truper, H G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. : The Prokaryotes, 2nd Ed., Vol II (ed. by H.

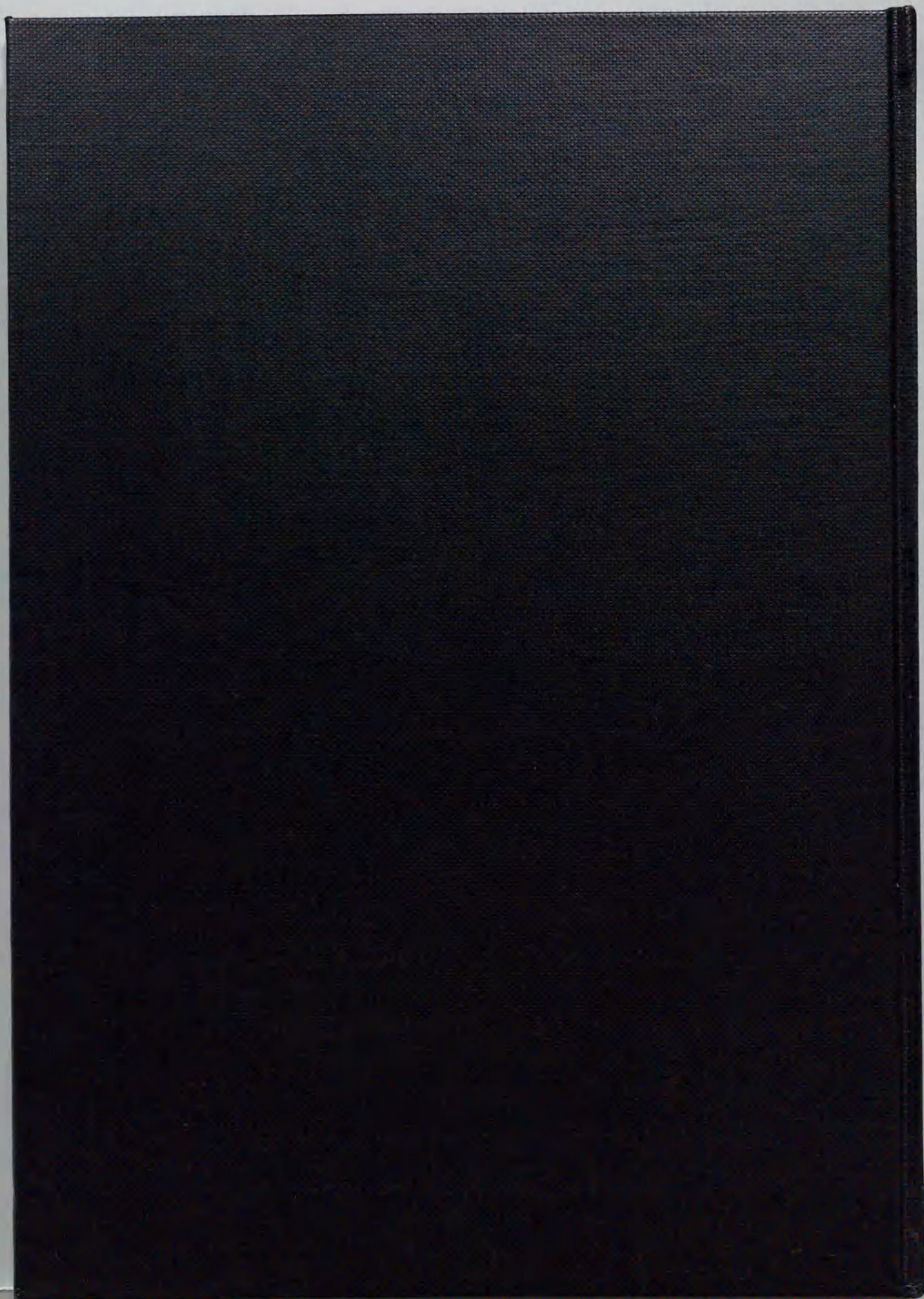
Hippe, J. R. Andreesen, G. Gottschalk and L. D.S. Smith),
1800-1878, Springer-Verlag (1992), New York.

37) Haller, E. J.: *Water/Engineering & Management*, 138, 30-31(1991).

38) 李文生、入江鎌三、青木満：し尿処理施設における優占細菌相と処理状況の解析に関する研究、防菌防黴、印刷中。

39) F.F.Dias and J.Bhat: *Appl. Microbiol.*, 12, 412, 1964.

40) W.O.Pipes: *Advan. Appl. Microbiol.*, 8, 77, 1967.



3

② 新投稿 原稿受取り通知

前略 毎々何かとご高配に預かります。

本日貴原稿「

し尿処理施設における優占細菌相と処理状況の
解析に関する研究

本文 40 枚、図 4 枚、表 1/1 枚、写真内 4 葉
確かに拝受いたしました。

ご多忙のところご執筆賜り厚くお礼申し上げます。

草々

記

受付No.: 08083001

掲載: ① Vol. . 月号 (月10日発行) 予定

② 随時 (編集委員会にて掲載月を決定)

校正: ① 月 日 ~ 月 日頃

※期間中ご不在の場合、お知らせください

② 本会で責任校正をさせていただきます

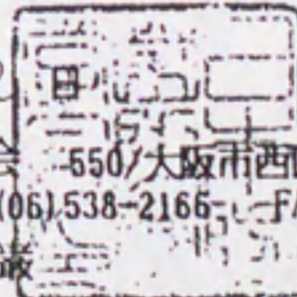
③ 追ってご連絡させていただきます

平成 8 年 9 月 2 日

日本防菌防黴学会 〒550/大阪市西区西本町1-13-38

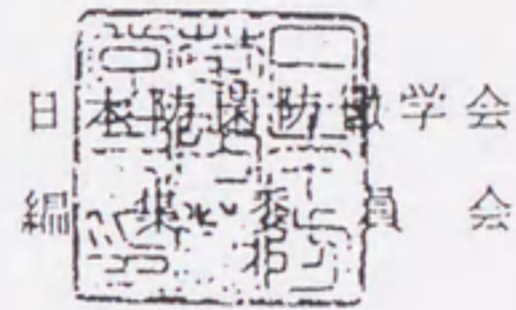
新興産ビル ☎ (06) 538-2165 FAX. (06) 538-2169

編集部: 山本 謙



平成 8 年 11 月 22 日

入江 鏖三 殿



前略 毎々格別のご高配ご協力を賜わり厚くお礼申し上げます。

先般ご投稿の審査結果が別紙の通りでしておりますので各指摘に従い訂正
加筆をお願いいたします。

全文、部分を書き直された場合新しい原稿とコピーをつけて下さい。

原稿の再投稿が著しく遅れる場合はご一報下さい。

草々

原稿返送希望日 H. 8 年 12 月 9 日 頃

- 掲載可となりましたが、ご指摘にに対し、ご訂正ください。
- 新原稿(正1, 副1部)と共に旧原稿(同封)もお返しください。
- フロッピーディスク(機種名, ソフト名も添付)もお送りください。

よろしくお願ひ申し上げます。

山本 巖

inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak