

II-492

ATP測定による固定化微生物の 定量について

京都大学工学部 正員 尾崎博明

吉成勝宏

正員 寺島 泰

1. はじめに 著者らは、通常の固定化微生物あるいは磁性体を含む固定化微生物に関する下・廃水処理¹⁾について検討を行っているが、基本となる固定化微生物量の定量については多くの困難があった。最近では、一方法としてアデノシン三リン酸(ATP)を測定することにより固定化微生物量を把握²⁾することが試みられており、有望な方法と考えられるものの、測定条件や方法については必ずしも明らかではない。本研究では磁性体を含有する場合も含めて、固定化微生物を粉碎後、ATPを迅速に抽出し、生物発光・化学発光測定装置により測定する方法について検討を加えたので報告する。

2. トリクロロ酢酸法(TCA法)による浮遊微生物中ATPの抽出と測定

微生物中 ATPの通常の測定方法(BTB法等)は煩雑であり、簡便な方法がより望ましい。杉崎ら³⁾は浮遊微生物に関し、トリクロロ酢酸(TCA)によりATPを抽出する方法が簡便さ及び抽出効率の点から非常に優れていることを確認している。本研究ではこの結果に従い、微生物中ATPの測定方法として図-1に示す方法を用いることとした。すなわち、ATPをTCAにより抽出後、ルシフェリン・ルシフェラーゼ溶液を加えて発光させ、その発光量をM社製生物発光・化学発光測定装置を用いて測定した。

固定化微生物中ATPの測定に先立ち、予備的検討として活性汚泥中のATPを同法により測定したところ、微生物量、とくにMLVSSとATPの間にはほぼ比例関係が認められ、とくに活性微生物量の測定法として同法が有効であることが示唆された。一方、活性汚泥を熱湯中に15分間浸漬して死滅させた後ATP量を測定したところ、図-2に示すように時間とともに減少し、90分後には存在しなくなった。このような結果は、Weddleら⁴⁾の報告にも見られ、ATPは非保存性であると考えられた。

3. 固定化微生物中のATP測定における前処理と測定例

3-1 実験方法 固定化微生物中ATPの測定に当っては、ATPの抽出が行われやすい前処理操作が必要であるが、強力な薬剤は微生物自体に損傷を与える可能性があるため用いることができない。ここでは固定化物をミキサーにより粉碎後、図-1に示した測定方法を採用することとし、適当な粉碎時間を決定するために以下の実験を行った。

千畑⁵⁾の方法により活性汚泥をアクリルアミド法により固定化し、同固定化物を粉碎時間を変えて粉碎、微小化して得た各試料のATPを測定した。対照として固定化前の活性汚泥のATP量も測定し、これより試料とした各固定化微生物中ATPの回収率を決定した。また、アクリルアミド法では、アクリルアミドモノマーのほか架橋剤、重合促進剤、重合開始剤など各種薬剤を添加するが、これらのうちアクリルアミドモノマーと重合促進剤であるβ-ジメチルアミノプロピオニトリルは微生物に対して悪影響を与えるとされており、重合開始剤以外の各種薬剤を添加した試料についてもATP測定を行った。さらに、κ-カラギーナン法、アルギニア酸カルシウム法によ

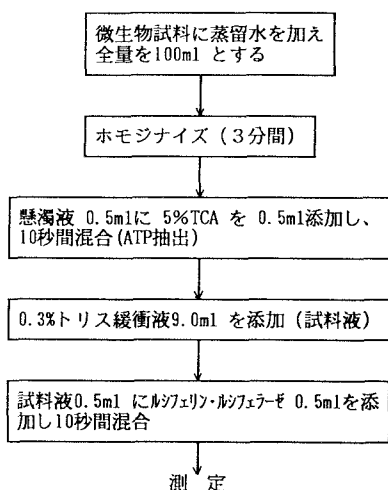


図-1 ATP測定手順

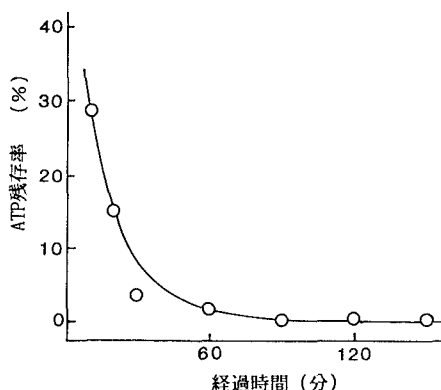


図-2 細胞死後のATP残存率

り得た固定化微生物についても同様の方法により ATP測定を行った。

3-2 実験結果と考察 ミキサーによる固定化粉砕時間と ATP回収率との関係を図-3に示す。この結果より、長時間の粉砕は ATP回収率を低下させ、5~7 分が適当な粉砕時間であることがわかった。ATP回収率は50~60%に留まったが、固定化薬剤の影響について調べた表-1の結果をあわせると、この低回収率は固定化薬剤の影響と考えられ、粉砕操作により固定化微生物中の ATPはほぼ測定されたと考えられる。表-2に示すように、 κ -カラギーナン法等により得た試料については ATPの90数%が測定されており、粉砕による前処理は ATP測定に有効であると判断される。

4. 磁性体を含む固定化物内微生物の ATP測定

4-1 実験方法 磁気的に回収しうる固定化微生物として検討を進めている、微生物と磁性体とを同時に固定化した固定化物について、固定化微生物中 ATPの測定に及ぼす磁性体の影響に関する検討を行った。

マグネタイト（強磁性体）あるいはピロリン酸マンガ（常磁性体）の量を数段階に変えて ATP標準液に添加し、それぞれの ATP量を測定した。また、上記のそれぞれの磁性体を活性汚泥とともにアクリルアミド法により固定化、粉砕した試料の ATP量を上記の方法により測定した。

4-2 実験結果と考察 磁性体を添加した ATP標準液について、ATP測定値に及ぼす添加磁性体量の影響を調べた結果を図-4に示す。磁性体無添加の場合を 100とした ATP測定効率、磁性体添加量料の増加とともに減少しており、その影響は大きい。表-3は、磁性体を添加した固定化微生物中の ATP減少率（ $= 1 - [\text{磁性体添加固定化微生物中の測定された ATP}] / [\text{磁性体無添加固定化微生物中の測定された ATP}]$ ）を示したものである。表中の標準液に関する ATP減少率と比較すると、ピロリン酸マンガの場合は両者の値は比較的一致しており、図-4による補正が可能であると考えられる。

5. まとめ 固定化微生物の定量では、粉砕後 TCAにより抽出し、生物発光・化学発光測定装置により測定する方法が有用であることがわかった。マグネタイトを含む固定化微生物の定量についてはさらに検討を加えていく必要がある。

- 〔文献〕1) H. Ozaki et. al.; IAWPRC 15th Biennial International Conference, Kyoto (1990).
 2) 中村ら；第22回下水道研究発表会講演集, 256 (1985).
 3) 杉崎ら；第26回下水道研究発表会講演集, 748 (1989).
 4) Weddle et al.; Water Research, 15, 621 (1971).
 5) 千畑ら；固定化酵素, 78 (1975).

表-3 磁性体添加による ATP測定値減少率

添加磁性体	磁性体量 ATP量 (mg/μg)	固定化微生物 (%)	標準液 (%)
マグネタイト	5.1	55.5	86
ピロリン酸 マンガ	9.3 6.1	83.3 74.4	83 68

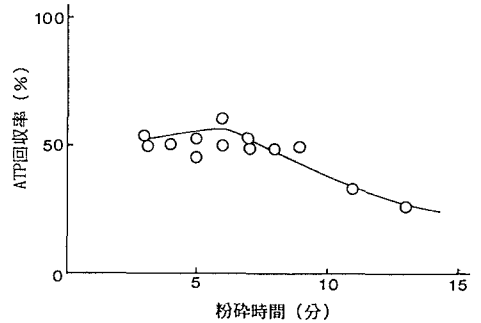


図-3 ATP測定に及ぼす粉砕時間の影響

表-1 活性汚泥中 ATPに及ぼす固定化薬剤の影響

試料	ATP 回収率 (%) (A を 100 とする)
A 活性汚泥	100.0
B 活性汚泥 (薬剤添加)	61.3
C 活性汚泥 (薬剤添加)	59.3
D 固定化汚泥	52.3

B: アクリルアミドのみ添加
 C: アクリルアミド、架橋剤、重合促進剤、重合開始剤を添加

表-2 各種固定化微生物中 ATPの回収率

試料	ATP回収率 (%) (A を100 とする)
A. 活性汚泥	100.0
B. アクリルアミド法	57.5
C. κ -カラギーナン法	94.9
D. アルギン酸カルシウム法	92.0

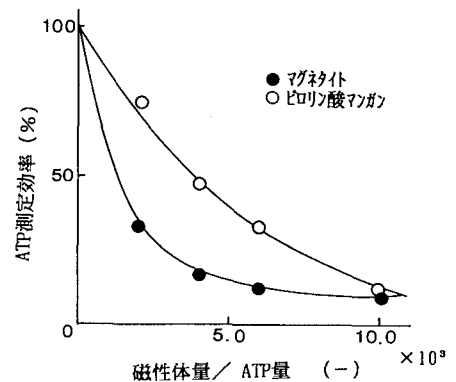


図-4 ATP測定に及ぼす磁性体添加の影響