

II-147

微生物凝集機構の影響因子に関する研究

大成建設(株)
長岡技術科学大学
建設省土木研究所

○正 員 末吉裕紀
正 員 桃井清至 学生員 小林民枝
正 員 滝沢 智

1. はじめに

現在広く行われている廃水の生物処理では、その系内に高活性な微生物を高濃度に保持することが処理性能向上のための大きな因子となっている。微生物自身の凝集性の良否は微生物の高濃度保持とともに、微生物群と処理水の固液分離操作に大きな影響を及ぼし、凝集性が悪化すると固液分離槽から浮遊菌体の流出が起こる。このような微生物の凝集には生物自身が産生する細胞外ポリマーが大きく関与していると考えられているが、その役割、凝集に関与する物質および凝集機構については詳細に知られていない。

本報では微生物の凝集を取り扱うにあたり、その原因物質と考えられている細胞外ポリマーの凝集能を評価する際、凝集基質となるカオリン、ポリマー抽出源の遊離菌体の凝集能の相違を比較検討した結果、および凝集に関与している物質について検討した結果について報告する。

2. 実験方法

① ポリマー抽出方法：ポリマー抽出源は脱窒リアクター(流入 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度1400mg/l,容積負荷21kg-N/ $\text{m}^3\text{/day}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ 除去率100%)から分取した脱窒菌グラニュールである。ポリマーは NaOH 、 EDTA 抽出により得た。ヒスコトロンでホモジナイズしたグラニュール汚泥に最終濃度で10mMとなるように NaOH 、 EDTA 溶液を加えロータリーシェーカー(35°C,138rpm)中で90分間振とう抽出し遠心分離(4°C,15000rpm,10分)で上澄液を回収、ろ過(0.65 μm 1回)する。 NaOH 抽出は HCl で中和したものを、また EDTA 抽出は蒸留水に対して48時間透析したものを細胞外ポリマーとした。

② 凝集基質の調製：カオリンは上水試験法に準じて調製し、蒸留水に懸濁させる。薬品処理菌体(ポリマー抽出後の菌体)はホモジナイズしたグラニュール汚泥をポリマー抽出方法と同様の操作でロータリーシェーカー中で振とうする。振とう後の汚泥-抽出液混合物を1日静置した時、上澄液中に遊離している菌体を遠心分離(4°C,15000rpm,10分)で回収し、蒸留水でよく洗浄して蒸留水に懸濁させる。機械処理菌体はグラニュールをホモジナイズしたものに純水を加えた後、薬品処理菌体と同様の操作を行う。

③ 凝集能試験の方法：各凝集基質懸濁液1ml, Ca^{2+} として CaCl_2 1ml(最終濃度5mM),10倍希釈液の添加濃度が0.1mg-TOC/mg-ssとなるように調製した抽出ポリマー1mlを20ml供給付試験管に入れ純水で全量を10mlにし、5(3)分間穏やかに傾斜混合後20(15)分間静置する(()内はカオリンの場合の時間)。凝集能は上澄4mlの OD_{600} を測定し、凝集基質のみを添加したブランクの OD_{600} に対する比(相対濁度)で評価した。

④ ポリマーの分子分画：分子分画にはSephacrose CL-2Bを用いた。溶出液は0.1M NaCl 溶液、溶出速度は8ml/ $\text{cm}^2\cdot\text{h}$ で5mlを1フラクションとして溶出液を採取し分画後の溶出液について糖、タンパクの測定、および凝集能試験を行った。

⑤ 除タンパク処理：ポリマーに10%トリクロール酢酸を等量加え4°C,24時間静置後遠心分離(4°C,15000rpm,10分)で沈澱物を除去する。次にジエチルエーテルを等量加えて分液ろう斗で激しく混合し数分静置した後下層部を回収する。同様の操作を3回行い回収した下層部を蒸留水に対して48時間透析したものを除タンパクポリマーとし、糖、タンパクの測定、および凝集能試験を行った。

⑥ β -脱離処理：ポリマーに最終濃度で0.1Nとなるように NaOH (最終濃度で0.3M NaBH_4 を含む)を加え、25°C,40時間静置する。静置後1~2滴の1-オクタノールを加え酢酸でpHを5.6に調整した後蒸留水に対して5°Cで72時間透析したものを β -脱離ポリマーとし、糖、タンパクの測定、および凝集能試験を行った。

3. 実験結果および考察

ポリマーと凝集基質を同一系内(ポリマー抽出溶液と薬品処理菌体取得時の溶液が同じ)で組み合わせて凝集能の相違を検討した結果を表-1に示す。カオリンはポリマーの種類に関わらず凝集した。一方、菌体は NaOH 抽出ポリマーでは凝集しなかったが、 EDTA 処理菌体が EDTA 抽出ポリマーとの組み合わせで凝集し、また凝集には Ca^{2+} が必要であった。そこで次に EDTA 抽出ポリマーと NaOH 処理菌体の組み合わせで凝集能を検討したところ、 NaOH 処理菌体は凝集しなかった(表-2)。 NaOH 処理菌体はその処理によって菌体の表面が損傷していると考えられることから、菌体の凝集にはポリマー、 Ca

Ca^{2+} が必要であると同時に菌体の表面性状も重要な役割を果たしていることが示唆された。EDTA抽出ポリマーをSepharose CL-2Bで分子分画した時の分画状況および凝集基質として薬品処理菌体とカオリンを用いた時の凝集能の相違を図-1, 2に示す。ポリマーは2つのピークに分画されそれぞれ糖, タンパクの溶出を伴う。またその凝集能は菌体を凝集基質とした場合、低分子物質であるピーク2の後半部分、すなわちタンパクとともに糖のピークが存在する画分でのみシャープに発現した。一方、カオリンはボイド部分で高分子物質であるピーク1付近で凝集し、その頂点ではポリマー濃度が高すぎるために凝集能は悪化した。したがってカオリンはポリマーの高分子物質が関与した吸着的要因で凝集する傾向が判明し、また菌体の凝集に関与する物質はピーク1には含まれておらず、低分子物質であるピーク2に存在することが明らかになった。次に菌体を凝集させることができるピーク2を除タンパク、 β -脱離処理した時の凝集能の変化、およびポリマーの性状の変化を調べた結果を表-3, 4に示す。無処理ポリマーに比較して相対濁度が上昇していることから、除タンパク処理後のポリマーの凝集能は低下していることが認められる。また同様にアルカリに不安定な糖タンパクの結合を分解する β -脱離処理によってもポリマーの凝集能は低下した。また除タンパク処理によってポリマー中のタンパクはほぼ100%除去されたが、同時に糖も約61%除去された。したがってこれらの結果と、ポリマーを分子分画した時、菌体の凝集能は糖とタンパクの両方が存在する画分でのみ発現することから、低分子物質であるピーク2に存在し、菌体の凝集に関与している物質は、結合様式がO-グリコシド結合である糖タンパクであることが示唆された。

表-1 ポリマー抽出方法と菌体取得方法による凝集能の相違

実験条件 ポリマーの種類	凝集基質の種類	凝集基質	凝集基質	凝集基質	相対濁度
			ポリマー	Ca ポリマー	
NaOH	カオリン	0.455	0.448	0.073	0.160
	薬品処理	0.494	0.484	0.471	0.953
	機械処理	0.532	0.526	0.518	0.974
EDTA	カオリン	0.455	0.447	0.099	0.218
	薬品処理	0.430	0.431	0.112	0.260
	機械処理	0.462	0.463	0.421	0.911

表-2 ポリマーと菌体を入れ換えた時の凝集能の相違

実験条件 ポリマーの種類	遊離菌体の種類	相対濁度
EDTA	EDTA	0.260
	NaOH	0.972

表-3 各種ポリマー処理による凝集能の変化

処理方法	相対濁度
無処理	0.352
除タンパク	0.527
β -脱離	0.542

表-4 除タンパク処理によるポリマーの性状変化 (mg/l)

処理状況	糖	タンパク
処理前	39.0	369.8
処理後	15.1	7.7
除去率(%)	61.3	97.9

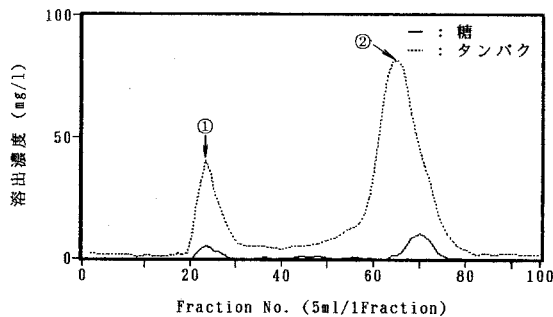


図-1 EDTA抽出ポリマーのSepharose CL-2Bによる分子分画

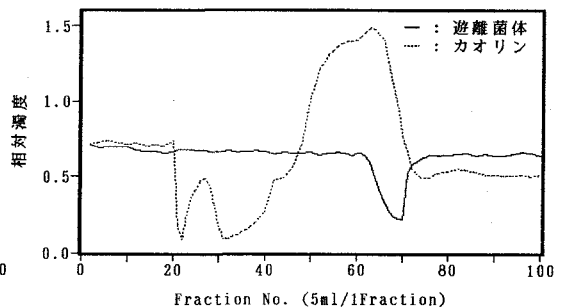


図-2 凝集基質の違いによる分子分画後の凝集能の比較

4. おわりに

本研究で以下の知見が得られた。1) EDTA抽出ポリマーと同時に得られる遊離菌体が Ca^{2+} 存在下凝集能を発現する。2) 菌体の表面性状も凝集に重要な役割を果たす。3) 菌体はポリマーを分子分画した時、低分子物質であるピーク2のうち糖とタンパクが存在する画分(Fraction No.60~75)でのみ凝集する。またカオリンはポリマーの高分子物質の作用による吸着的要因でピーク1で凝集することから両者の凝集機構は異なる。4) ピーク2を除タンパク処理するとタンパクとともに糖も除去され、同時に凝集能は低下し、また β -脱離処理によっても凝集能は低下する。5) 菌体に対する凝集能発現物質は低分子物質であるピーク2に存在し、結合様式がO-グリコシド結合である糖タンパクである。