

II-149

好気性及び嫌気性微生物群から抽出した細胞外ポリマーの凝集能

長岡技術科学大学 ○学生員 小林民枝
 正員 桃井清至
 大成建設（株） 正員 末吉裕紀

1. はじめに

生物学的廃水処理システムにおいて最も重要なのは微生物自身の凝集、集塊による沈降性のよいフロック（グラニュール）の形成である。微生物の凝集には、細胞外ポリマーが大きな役割を果たしていると考えられているがその凝集機構や凝集に関与している物質、役割については不明点が多い。

本報では、活性汚泥とUSB、UASBリアクターより採取した汚泥から細胞外ポリマーを抽出し、その凝集能について凝集対象物を各種用いて行った実験の結果、および環境因子が変化した時、その凝集能発現物質の挙動について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

1) 試料： 試料汚泥としてa)糖系基質UASBリアクター、b)USB脱窒リアクターより分取したグラニュール（ジュース馴養菌、脱窒菌と称す）及び、c)グルコースを唯一の炭素源として馴養した活性汚泥（培地組成表-1）を用いた。

また、活性汚泥に対しては環境条件を3つ設定した。①Control系（pH7, 25°C, 0.3kg-TOC/kg-vss/day）、②pH5系（pH5, 25°C, 0.3kg-TOC/kg-vss/day）③基質過剰系（pH7, 25°C, 1kg-TOC/kg-vss/day）の各条件である。

2) ポリマー抽出方法： 各汚泥を蒸留水で3回基質洗浄した後、ヒスコトロンでホモジナイズする。汚泥と最終濃度10mMのEDTAを三角フラスコに入れ、ロータリーシェーカーで振とう（35°C, 38rpm, 90min）した後、遠心分離（4°C, 15000rpm, 10min）で上澄みを回収し、ろ過（0.65μm, 1回）する。ろ液を透析（48時間）し、エバポレーター（35°C）で濃縮したものをEDTA抽出ポリマーとする。

3) 凝集対象物の回収： 脱窒菌体、ジュース馴養菌体については、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で振とうする。振とうした液を1時間静置した時の上澄み液中に遊離している菌体を遠心分離（4°C, 15000rpm, 10min）で回収し、蒸留水でよく洗浄してから蒸留水に懸濁させ、これを凝集対象物とした。

E. coliについては、栄養培地で48時間振とう培養（138rpm, 35°C）したものを遠心分離（4°C, 15000rpm, 10min）により回収し、EDTA（最終濃度10mM）で振とうした。振とう液から遠心分離で菌体を回収し、蒸留水で洗浄後蒸留水に懸濁し、これを凝集対象物とした。

4) 凝集能試験： 凝集対象物、Ca²⁺としてCaCl₂（最終濃度5mM）、分子分画したポリマー各1mlを20ml 供給付き試験管にいれ純水で全量を10mlにし、モノシンで3分間振とうした後20分間静置する。試験管中の上澄み4mlの濁度（OD₆₆₀）を測定し、凝集対象物のみを添加したブランクの濁度に対する比（相対濁度）で評価した。

5) ポリマーの分子分画： 分子分画にはSepharose CL-2Bを用いた（溶出液：0.1M NaCl溶液、溶出速度：8ml/cm²・h、5ml/1 fraction）。分画後の溶出液について相対タンパク濃度を分光光度計（280nm）にて測定した。

3. 結果及び考察

抽出したポリマーは抽出源がいずれのものでも2つのピークに分画された。この分子分画したポリマーに対して、3種類の凝集対象物を与えて凝集能試験をした結果を図-1に示す。

グラニュール汚泥から回収した遊離菌体（ジュース馴養菌体、脱窒菌体）を凝集対象物として用いた試験の結果、凝集能はピーク2付近（fraction No.70前後）で顕著に現れた。また、この凝集能はそれ自身が分泌したポリマー以外のポリマーに対しても良好に現れる。このことはグラニュール形成にはピーク2

表-1 活性汚泥の培地組成

C ₆ H ₁₂ O ₆	1000mg-TOC/l (3000mg-TOC/l)
NH ₄ Cl	50 mg/l
KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ HPO ₄	36 200 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O FeCl ₂ CuSO ₄ ·5H ₂ O MgCl ₂ ·6H ₂ O MnSO ₄ ·4H ₂ O CaCl ₂ ·2H ₂ O Na ₂ SO ₄	1.2 1.0 5.0 5.0 33.0 15.0 36.8 53.5 mg/l
KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	20mM (bufferとして)

物質が微生物凝集に大きく関与しており、また、このピーク2物質はどんな微生物も分泌しているであろうことが伺える。しかし、このポリマーに対して通常の培養では凝集することのないE.coliを凝集対象物として試験をした結果、E.coliに対しては凝集能は全くみられず、ピーク2物質は凝集性細菌群にのみ凝集能発現物質として作用することが推察される。

また、環境条件を変えて培養した活性汚泥の分子分画状況を図-2に示す。Control系ではピーク1に対してピーク2のエリア面積が非常に大きいことがわかる。これに対し、pH5系と基質過剰系で培養してきた汚泥のポリマーはピーク2のエリアが小さく、ピーク1との比をとってみると図-3のようになり、SVIが大きいほど(表-2)ピーク2の割合が減少している。凝集能発現物質と考えられるピーク2物質はどの環境条件でも分泌されているが、今後ピーク2に含まれる凝集能発現物質の環境条件の相違にともなう組成変化について検討する必要があると思われる。

4. おわりに

本研究により以下の知見が得られた。

- ①好気性、嫌気性に関わらずEDTA振とう抽出したポリマーはSepharose CL-2Bによる分子分画で2つのピークが得られ、そのピーク2にはEDTA遊離菌体を再凝集させる効果がある。
- ②EDTA抽出ポリマーはそれ自身から回収した遊離菌体以外の菌体も凝集させることができるが、E.coliを凝集させることはできない。
- ③SVIの大きいバルキング汚泥はピーク1に比べピーク2の割合が少ない。

表-2 各系のSVI

Control系	66
pH 5系	109
基質過剰系	201

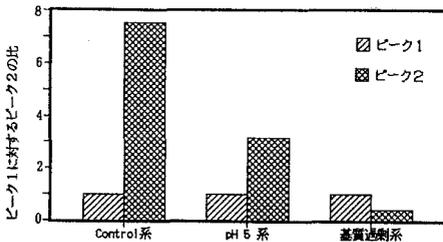


図-3 相対タンパク濃度エリアの比

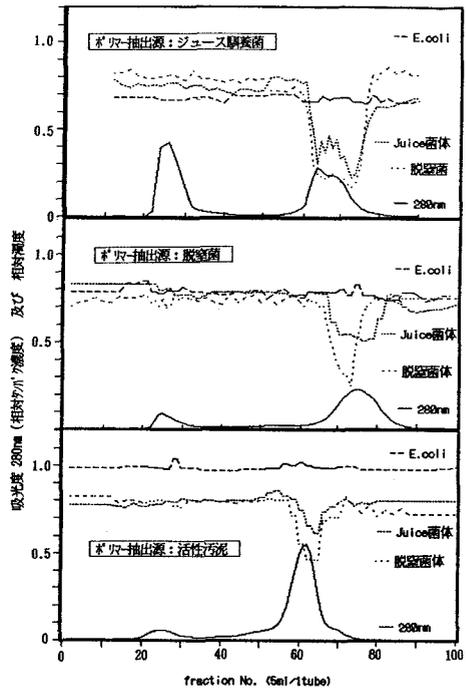


図-1 EDTA抽出ポリマーのSepharose CL-2B分子分画

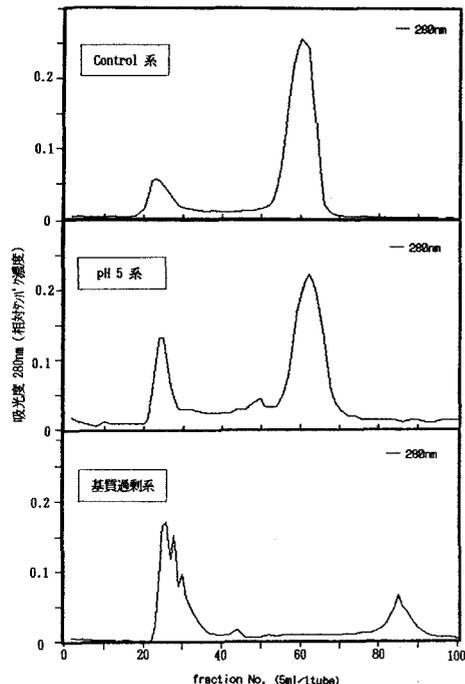


図-2 環境条件と相対蛋白濃度