

II-365

微生物凝集に及ぼす細胞外ポリマーの凝集能発現物質の分離

新潟県 ○正員 小林民枝
長岡技術科学大学 正員 原田秀樹 桃井清至

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な点が多い。

本報では、USB脱窒リアクターより採取したグラニュール汚泥から細胞外ポリマーを抽出し、その凝集能発現物質の分離について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

1) 試料：ポリマー抽出源の汚泥は脱窒リアクター（流入 $\text{NO}_3\text{-N}$ 600mg/l, 容積負荷 $9\text{kg-N/m}^3/\text{day}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ 除去率100%）から分取した脱窒菌グラニュールである。

2) ポリマー抽出方法：

①Sephacryl CL-2B供試用ポリマー：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 , 138rpm, 60min）した後、遠心分離（ 4°C , 15000rpm, 10min）で上澄みを回収し、ろ過（ $0.64\mu\text{m}$, 1回）する。ろ液を透析（48時間）し、凍結乾燥で濃縮したものをEDTA抽出ポリマーとする。

②Sephacryl S-200HR供試用ポリマー：Sephacryl CL-2Bにより分画された脱窒菌ポリマーの第2ピークを回収し48時間透析、その後凍結乾燥し乾燥試料を純水に溶解させたものを試料とする。

3) 凝集対象物の回収：遊離菌体については、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 , 1500rpm, 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。

カオリンの調整方法は上水試験法⁵⁾に準じて調整し、蒸留水に懸濁した。

4) 凝集能試験：① 凝集対象物、 Ca^{2+} として CaCl_2 （最終濃度2mM）、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。② ①の方法と同様にセットした試験管をロータリーシェーカーで15分間振とうし、振とう後のサンプルを実体顕微鏡で観察した。フロック形成の有無をブランク系と比較し、フロックの大きさや量から、（－，＋，＋＋，＋＋＋）の4段階評価を行った。また、カオリンを凝集対象物とした場合には振とう後15分間静置し、①と同様に相対濁度を測定した。

5) ポリマーの分子分画：分子分画にはSephacryl CL-2B、Sephacryl S-200HR、の2種を用いた（溶出液：0.1N NaCl溶液、溶出速度：1ml/min、5ml/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）、またはLowry法にて測定し、糖濃度はフェノール-硫酸法で測定した。

6) 凝集フロックのEDTA処理：ポリマーにより凝集したカオリンフロックをポリマー抽出操作と同様に最終濃度10mM EDTA溶液で振とうし、振とう後15分静置し、静置後の上澄みを分光光度計で測定する。この時、EDTA溶液の代わりに純水で振



写真1 脱窒菌グラニュールのポリマー分泌状況（上）とポリマー抽出後（下）のSEM観察写真

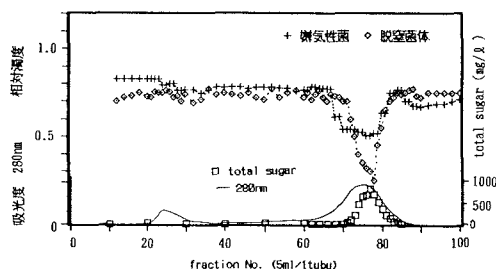


図-1 Sephadex CL-2B 分画ポリマーの糖、タンパクの溶出状況と凝集能

こうしたものをブランク系とする。

3. 実験結果および考察

抽出したポリマーをSephacryl CL-2Bで分画すると大きく2つのピークに分画され、それぞれ糖とタンパクの溶出を伴う。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。遊離菌体（嫌気性菌、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。これよりピーク2画分に凝集誘因物質が含まれると推察される。そしてこのピーク2物質をさらに低分子分画範囲のSephacryl S-200HRを用いて分画を行った。その結果を図-2に示す。図-1に示したSephacryl CL-2Bで分子分画したときには、ピーク2物質として現れた糖とタンパクのピークはほとんど同じフラクションで溶出しており、凝集能発現物質は糖タンパク複合体ではないかと考えられてきていたが、分画範囲の小さな、Sephacryl S-200HRによる分画で、糖とタンパクが明らかに別々のピークを示し、この結果から糖とタンパクは複合体をなしていないことがわかる。次に、この分画ポリマーのどのフラクションに凝集能が存在するのかを凝集能試験（凝集能試験方法②）によって確認した。その結果、遊離菌体を用いての顕鏡観察の場合にはfraction No.54~65で（表-1）、カオリンを凝集対象物として用いた場合にはfraction No.50番台から60番にかけて（図-2下）と、異なる凝集対象物を用いてみてもほぼ同じ画分で凝集能が現れた。そして、その画分は糖のピークと一致する。したがって、凝集能発現物質は“多糖”であると断定して良いものと考えられた。また、この時の凝集能試験でフロックを形成したカオリン凝集体に対して、EDTA処理を施したところ、凝集体は顕著に分散した（ブランク系と比較した場合、その濁度の上昇は初期の濁度の3倍弱である。）（図-3）。遊離菌体やカオリンはポリマーのみ、またはカチオンのみ存在では凝集しないが、ポリマーとカチオンが両者存在したときに効果的に凝集する。

4. まとめ

- 本研究で得られた知見を以下にまとめる。
- ① EDTA抽出したポリマーはSephacryl 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には遊離菌体を再凝集させる効果がある。
 - ② ピーク2物質をSephacryl S-200HRでさらに分子分画すると糖と、タンパク別々のピークを示し、凝集能発現物質が糖タンパク複合体であるという従来の推論は否定された。
 - ③ 凝集に関与している物質は多糖であり、その分子量はおおよそ1500以上～2万以下である。
 - ④ フロック形成には Ca^{2+} が必要であり、ポリマーと凝集対象物は Ca^{2+} を介してイオン結合をしている。

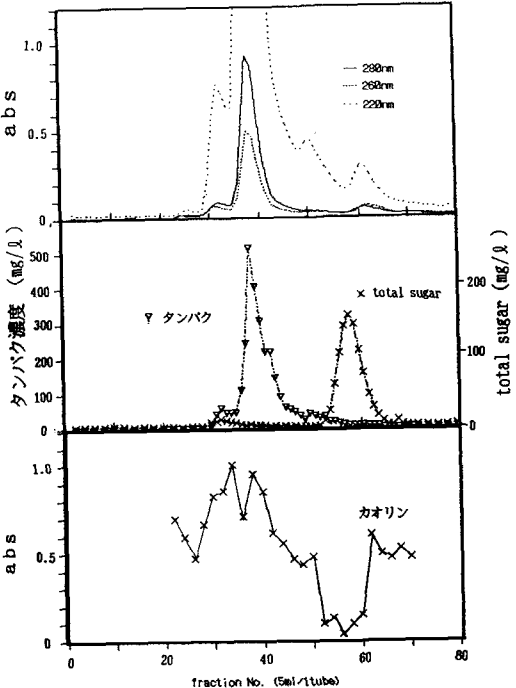


図-2 Sephadex S-200HR分画ポリマーの糖、タンパクの溶出状況と凝集能
(上) 紫外吸光度 (中) 糖タンパク濃度 (下) カオリン凝集能

表-1 Sephadex S-200HR 分画ポリマーの菌体凝集能
(実体顕微鏡観察による)

No.	評価	No.	評価	No.	評価	No.	評価
31	-	41	-	51	-	61	+
32	-	42	-	52	-	62	+
33	-	43	-	53	-	63	+
34	-	44	-	54	+	64	+
35	-	45	-	55	+	65	++
36	-	46	-	56	+	66	-
37	-	47	-	57	+	67	-
38	-	48	-	58	+	68	-
39	-	49	-	59	+	69	-
40	-	50	-	60	++	70	-

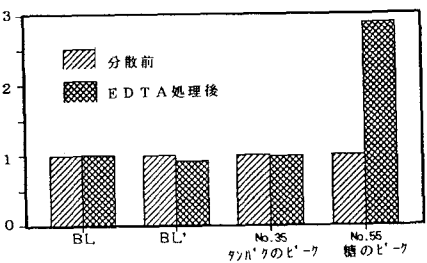


図-3 カオリンフロックのEDTA処理によるデフロック度
(各系のブランク系を1とした場合のデフロック度)