

シヨ糖溶液を用いて比重分画した実下水処理嫌気好気活性污泥のキノプロファイル解析

豊橋技術科学大学 正会員 藤田 昌史
 東京大学 正会員 古米 弘明, 正会員 中島 典之
 豊橋技術科学大学 藤江 幸一

1. はじめに

近年, 閉鎖性水域における窒素・リンの水質環境基準の達成あるいは余剰污泥からのリン回収の観点から, 生物学的リン除去の必要性が増してきている。しかしながら, その主要な役割を担うポリリン酸蓄積細菌群 (PAOs) については, 未だに十分な知見が得られていない現状にある。本研究では, 人工基質で馴致された污泥ではなく実下水を処理する污泥に存在する PAOs に着目した。一般細菌と PAOs との比重差を利用して, シヨ糖溶液を用いて実下水を嫌気好気法で処理する活性污泥を分画した。そして, そのキノプロファイルの違いを調べることにより, PAOs のバイオマーカー探索の可能性を検討することを試みた。

2. 原理

活性污泥の比重は $1.02 \sim 1.06 \text{g/cm}^3$ に分布していると報告されている¹⁾。一方, ポリリン酸顆粒の比重は 1.23g/cm^3 といわれているため, PAOs が細胞内にポリリン酸を高濃度に含有した状態では, 他の細菌よりも比重が大きくなると考えられる。したがって, フロックを分散させた活性污泥を, 適切に密度を調整した溶液の上に重層して遠心分離を行えば, PAOs を下層側に分画することが可能であると予想される。細菌の分画を目的とした場合, 密度溶液として Percol やシヨ糖溶液が広く用いられているが, 本研究では, PAOs の一種である *Microtholus phosphovorus*²⁾ が単離培養された際に用いられた実績もあり, Percol に比べて污泥の再凝集が起こりにくいと報告²⁾されているシヨ糖溶液を用いた。

3. 実験方法

シヨ糖溶液を用いた污泥の比重分画の手順を図-1 に示した。

(1) 活性污泥の準備

都市下水に酢酸ナトリウムを添加して長期間運転していた嫌気好気回分式活性污泥³⁾を曝気工程終了直前に採取した。污泥のリン含有率は 3.5% of MLSS であった。この污泥の MLSS を 4000 mg/L 程度に調整した。

(2) パラホルムアルデヒドによる固定

浸透圧が高いシヨ糖溶液のなかで, 污泥の溶菌を防ぐために, 4%パラホルムアルデヒドを污泥量に対し 3 容加え, その後 3 時間冷蔵した。

(3) 污泥フロックの分散

物質の沈降には, その径および比重が影響するため, 污泥を遠心分離する前に, 污泥フロックを適切に分散しておく必要がある。そこで, サンプル污泥を冷やししながら, ホモジナイザーにより分散処理 (2cm, 3500rpm, 15 min) を行った。

(4) ステンレスメッシュの通過

分散済みのサンプル污泥を, 孔径 $45 \mu\text{m}$ および $20 \mu\text{m}$ のステンレスメッシュをそれぞれ重ねて吸引濾過し, メッシュを通過したサンプル污泥を回収した。

(5) シヨ糖溶液に重層, 遠心分離

50.0%, 51.2% および 52.4% に調整したシヨ糖溶液 70mL のうに, メッシュを通過した污泥 15mL をそれぞれ重層し, 遠心分離 (3500rpm, 20min, 4) した。

(6) 分画した污泥の回収および洗浄

遠沈後, 総量 85mL のうち, 上から約 70mL (上層) と下に残った 15mL (下層) を別々に回収した。污泥に付着したシヨ糖を取り除くために, 回収したそれぞれの污泥に冷水を加え, 再び遠心分離 (14000rpm, 10min) を行った後, 上澄み液を捨てた。この洗浄作業を 2 回繰り返した。その後, そのサンプルの一部を, 2 枚重ねた GF/F フィルターに吸引する過により回収した。さらに, サンプル量の 4 倍量の冷水を加え吸引する過を行い, 再び污泥を洗浄した。

(7) 分画した污泥の MLSS, T-P およびキノ分析

GF/F フィルターに回収したそれぞれの污泥については, MLSS および T-P をそれぞれ分析し, 污泥のリン含有率を求めた。一方, 回収しなかった残りの污泥については, キノプロファイル分析⁴⁾を行った。

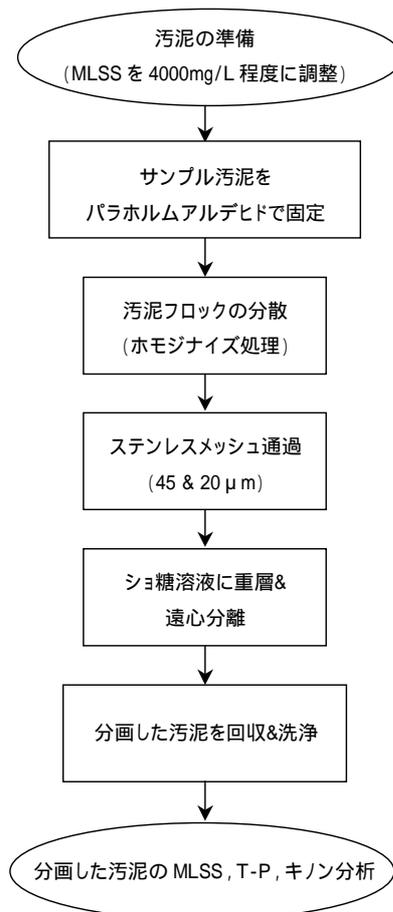


図-1 污泥の比重分画の手順

キーワード：シヨ糖溶液, 遠心分離, ポリリン酸蓄積細菌群, 嫌気好気回分式活性污泥, キノプロファイル法, バイオマーカー
 〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1 Tel: 0532-44-6923, Fax: 0532-44-9614, E-mail: fujita@fujielab.eco.tut.ac.jp 藤田 昌史

4. 結果および考察

(1) 分画した汚泥のリン含有率

メッシュを通過した汚泥の MLSS および T-P は、それぞれ 2800 mg-SS/L、81.4 mg-P/L であり、汚泥リン含有率は 2.9% であった。リアクターからサンプリングしたときの汚泥リン含有率は 3.5% であったため、ホモジナイズ処理やステンレスメッシュを用いた吸引過作業の間に、0.6% 分のリンが消失した。

ショ糖濃度を 3 段階に設定したそれぞれのケースで、上層および下層に分画されたサンプル汚泥の MLSS、T-P、そして両者から算出される汚泥リン含有率を、それぞれ表-1 に示した。ただし、表中に示した MLSS および T-P は、ショ糖溶液中での濃度ではなく、ショ糖溶液に重層した 15mL に対する濃度を示した。設定したショ糖溶液の濃度が増すにしたがって、遠心分離を行っても沈まなかった汚泥（上層）の濃度が高くなっていき、逆に、沈んだ汚泥（下層）の濃度は低くなっていった。汚泥が適切に分画されたものと判断される。

ショ糖濃度を 50.0% と 52.4% に設定したケースでは上層に、51.2% のケースでは下層に、相対的にリン含有率の高い汚泥が回収された。この理由については、PAOs のリン含有率は同じではなく幅があるということ仮定したうえで、次のように説明できると考えられる。50.0% のケースでは、一部の PAOs が上層に存在していたものの、大部分の PAOs は下層に存在していたものと考えられる。しかしながら、PAOs 以外の細菌で、比重が大きい細菌も同時に下層に存在していたため、相対的に下層の汚泥リン含有率は高くなり、逆に上層の汚泥リン含有率の方が高かったと考えられる。51.2% のケースでも、大部分の PAOs は下層に存在していたと考えられるが、50.0% のケースで下層に存在していた比重の大きい細菌が、このケースでは下層には存在せず上層に存在していたため、汚泥リン含有率が 50.0% のケースと逆転したものと考えられる。52.4% のケースでは、予想に反して下層よりも上層の汚泥リン含有率の方が高くなったが、これはこのショ糖濃度では大部分の PAOs が下層まで沈降することができず、上層に存在していたためと考えられる。そのため、汚泥リン含有率が再び逆転したものと考えられる。

(2) 分画した汚泥のキノプロファイル

ショ糖濃度を 51.2% に設定したケースにおいて、上層および下層に分画したサンプル汚泥のキノプロファイルを図-2 に示した。上層および下層に分画されたいずれの汚泥でも、ユビキノンの優占分子種は Q-8 であり、これに続いて Q-10、Q-9 が検出された。メナキノンについては、MK-8 が優占分子種であり、これに続いて MK-7、MK-9 (H8) が検出された。分画された汚泥の間には、優占キノノン種の順序に違いは見られなかった。

前述したように、ショ糖濃度を 51.2% に設定したケースでは、上層よりも下層の方に PAOs が相対的に多く存在したものと判断されることから、上層よりも下層において高い割合で存在したキノノン種のなかにも、PAOs が持つキノノン種が含まれると考えられる。そこで、両者の存在比を比較した（図-2）。

検出された 10 種類のキノノン種のうち、上層より下層で高い割合で存在したキノノン種は、ユビキノンは Q-8、メナキノンでは MK-7、MK-8 (H4)、MK-9 (H8) の合計 4 種類であった。それぞれ上層より、2.1%、2.3%、0.8%、1.3% 高い割合で存在していた。平石⁵⁾によって提案されている非類似度の解釈の基準から、それぞれのキノノン種の存在比にどの程度の差があれば有意であるか試算した。本実験では 10 種類のキノノン種が検出されていることから、キノプロファイルに相違があると見なされる非類似度 0.1 を上回るためには、両者のキノノン存在比に 2% 以上の差が必要であると見積もられた。したがって、上述した 4 種類のキノノン種のうち、Q-8 および MK-7 は有意であると判断された。現在、PAOs の一種であると考えられている *Rhodocyclus* 属⁶⁾ のキノノン種が報告された例はないが、*-Proteobacteria* に属することから、本研究で見出された Q-8 を含有するものと予想される。一方、MK-7 は実下水を処理する嫌気好気回分式活性汚泥において、生物学的リン除去活性の変化と対応が見られたキノノン種のひとつである³⁾。ただし、これらのなかにはポリリン酸の含有とは無関係で、単に他の細菌に比べて比重が大きい細菌のキノノン種も含まれている可能性もある。しかしながら、本実験では上層と下層のキノプロファイルにはそれほど大きな違いは見られなかったことから、PAOs 以外の細菌で比重が相対的に大きいものと小さいもの間には、キノプロファイルに明確な違いは現れないものと考えられる。したがって、リン含有率の高い汚泥を対象にこの比重分画の方法を適用すれば、上層よりも下層でより大きな存在比をとるキノノン種が存在し、そのキノノン種は PAOs が含有するものである可能性が高いと考えられる。

今後は、実下水を処理しながらもリン含有率の高い汚泥を用いて、汚泥リン含有率に顕著な差が見られる分画汚泥のキノプロファイルの違いを調べることで、本研究で得られた知見の妥当性が確認できるとともに新たな知見が得られるものと考えている。

参考文献 1) Dammel et al. (1991): *Wat. Res.*, **25**, 7, 841-846. 2) Nakamura et al. (1995): *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 17-22. 3) 藤田 (2001): 東大博士論文. 4) Fujie et al. (1994): *Wat. Sci. Tech.*, **29**, 373-376. 5) 平石 (1992): *水環境学雑誌*, **15**, 9, 558-563. 6) Hesselmann et al. (1999): *Syst. Appl. Microbiol.*, **66**, 3, 1175-1182.

表-1 分画した汚泥の MLSS、T-P およびリン含有率

	50.0%	51.2%	52.4%
上層	918	1020	1121
下層	1938	1733	1632
合計	2856	2753	2753

単位 (mg-SS/L)

	50.0%	51.2%	52.4%
上層	28.8	27.9	34.8
下層	53.8	55.1	45.7
合計	82.6	83.0	80.5

単位 (mg-P/L)

	50.0%	51.2%	52.4%
上層	3.1	2.7	3.1
下層	2.8	3.2	2.8

単位 (% of MLSS)

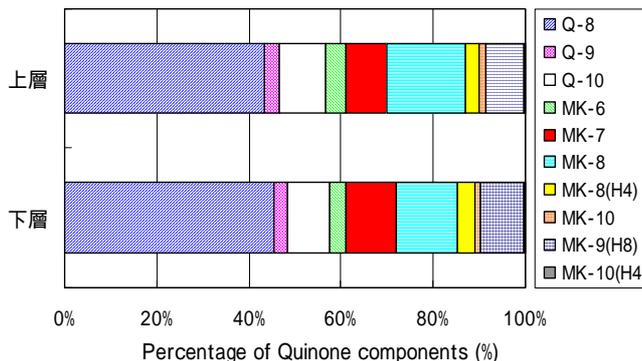


図-2 分画した汚泥のキノプロファイル