

都市下水処理場における標準活性汚泥の総抗酸化力の動態

茨城大学大学院 学生会員 ○王 峰宇 正会員 藤田 昌史

1. はじめに

下水処理では活性汚泥法が広く用いられている。活性汚泥の研究は古いが、当初はブラックボックスとして取り扱われていた。1980年代には生化学的なアプローチにより生物学的リン除去の機構が明らかにされ、1990年代以降は分子生物学的手法により微生物群集構造の解析が進められている¹⁾。

好気性生物は酸素を消費すると体内で活性酸素種が生成し、それを除去するためにエネルギーを投じて抗酸化成分を合成し、細胞の損傷を予防することが知られている²⁾。二枚貝などの水生生物の研究では、抗酸化成分はストレスバイオマーカーとして利用されているが³⁾、活性汚泥に適用した例はない。活性汚泥ブラックボックスを紐解くためには、多角的にアプローチする必要があると考えられる。

そこで本研究では、ORAC法(Oxygen Radical Absorbance Capacity)を用いて、都市下水を処理する標準活性汚泥の総抗酸化力の動態を調べた。

2. 実験方法

2-1 活性汚泥微生物の採取

標準活性汚泥法を採用している公共下水処理場を対象とした。1つの系列が隔壁で6槽に区切られており、前段の2槽(A1, A2槽)では曝気を止めており、後段の4槽(O1~O4槽)ではすべて曝気を行っている。活性汚泥微生物の採取は2018年の1月12日、2月8日と6月28日に各槽の末端で行った。

2-2 細胞内溶解性タンパク質の抽出と分析

活性汚泥微生物の細胞内の抗酸化成分(酵素・物質)は溶解性タンパク質である³⁾。一方、EPSにも溶解性タンパク質が存在する。細胞内の溶解性タンパク質を抽出するために、本研究では陽イオン交換樹脂法⁴⁾でEPSを抽出し、目開き500 μ mのふるいで活性汚泥微生物の

みを回収した。その後、ホモジナイザー(7,500rpm, 3min, OMNI International, GLH)で分散処理し、遠心分離(12,000g, 4°C, 15min, KOKUSAN, H-1500R α)で回収した上澄み液を試料とした。また、ローリー法を用いて溶解性タンパク質の分析を行った。

2-3 ORAC 分析

ORAC法はラジカル開始剤によって分解されるフルオレセイン(蛍光プローブ)の蛍光強度を経時的に測定し、総抗酸化力を定量する方法である⁵⁾。上述した方法で回収した試料30 μ Lにラジカル開始剤であるAAPH(2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride, 50mM)60 μ Lとフルオレセイン150 μ L(125.2nM)を添加し、37°Cで2分間おきに2時間にわたり蛍光強度を測定した。なお、蛍光分析はマイクロプレートリーダー(infinite F200PRO, TECAN)を用いて、励起波長485nm、測定波長528nmで測定した。そして、既報²⁾に従い、試料の蛍光強度の曲線下面積とブランクの曲線下面積の差をTrolox当量に換算し、それを溶解性タンパク質量で除したものをORACとした。

3. 実験結果と考察

3-1 活性汚泥微生物のEPSの総抗酸化力

活性汚泥微生物のEPSと細胞内の溶解性タンパク質量を図1に示した。EPSの溶解性タンパク質量は36 $\pm$ 4~44 $\pm$ 10mg/gVSSであり、既報⁶⁾と同レベルであった。また、EPSと細胞内の溶解性タンパク質の合計に対し、EPSは約8割を占めていた。活性汚泥微生物の細胞内のORACを評価するためには、EPSの溶解性タンパク質を取り除く必要がある。本手法により、細胞外(EPS)と細胞内の溶解性タンパク質をわけて抽出できたと言える。

活性汚泥微生物のEPSと細胞内のORACを図2に示した。EPSと細胞内のORAC値の合計に対し、EPS

キーワード 標準活性汚泥, ORAC法, 総抗酸化力, 溶解性タンパク質, EPS

連絡先 〒316-8511 茨城県日立市中成沢町4-12-1 茨城大学大学院理工学研究科社会インフラシステム科学専攻

E-mail: 16nd302n@vc.ibaraki.ac.jp

は約 5 割を占めていた。抗酸化成分は細胞内で合成されるものであり、その分子量が 10^5 以上⁷⁾もあるため、細胞膜を通過できない。そこで、EPS が ORAC を示した理由は活性汚泥微生物がファージで溶菌された後に、細胞内の抗酸化物質が EPS に含まれたことが考えられる。以上の結果から、EPS は抗酸化能をもつ可能性が示された。

3-2 下水処理場における活性汚泥微生物の総抗酸化力の動態

各槽から採取した活性汚泥微生物の ORAC と DOC の結果を示した (図 3)。DOC は A1 槽から O4 槽まで減少した。一方、ORAC の値には有意差がなかった ($p>0.05$)。好気性生物は好気代謝をすると、細胞内で活性酸素種の生成と抗酸化成分の合成が行われる⁸⁾。A1 槽と A2 槽では曝気はされていないが、開放されているため、空気中の酸素が槽内に透過し、活性汚泥微生物に利用されたことは十分に考えられる。この場合、細胞内で活性酸素種が生成し、抗酸化成分が消費されることになるが、調査日の A1 槽流入水の有機物濃度は異なるため、A1 槽と A2 槽では ORAC がばらついていたと考えられる。曝気されていた O1 槽から O4 槽では、活性汚泥微生物の細胞内において抗酸化成分の消費と合成が同時に起こるため、ORAC はそれほど変化がなかったと考えられる。

O1 槽から O4 槽では、A1 槽、A2 槽とは対照的に ORAC のばらつきが収まる傾向が見られた。好気性微生物は有機物を利用して抗酸化成分を合成する⁸⁾。有機物を利用するとき細胞内で抗酸化成分の消費と合成が起こるため、ORAC は処理場の前段で流入有機物濃度の違いにより相対的に大きいばらつきを示したのに対し、後段では利用できる有機物が減少したため、ばらつきが相対的に小さかったものと考えられる。以上の結果より、反応槽での有機物濃度は活性汚泥微生物の総抗酸化力に大きく影響することがわかった。

4. まとめ

本研究では ORAC 法を用いて標準活性汚泥の総抗酸化力の動態を調べた。活性汚泥微生物の EPS は

参考文献

- 1) Henze (2008) *IWA publishing*, 53–86.
- 2) Regoli (2000) *Aquatic Toxicology* 50, 351–361.
- 3) 池田ら (2016) 土木学会論文集 B2(海岸工学) 70 (7), 1351–1356.
- 4) Frølund et al. (1996) *Water Research* 30(8), 1749–1758.

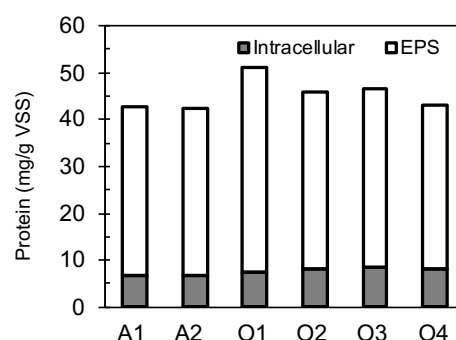


図1 活性汚泥微生物のEPS及び細胞内の溶解性タンパク質

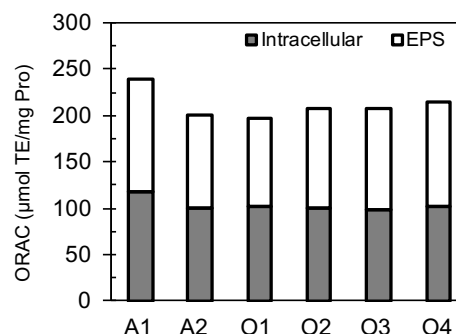


図2 活性汚泥微生物のEPS及び細胞内のORAC

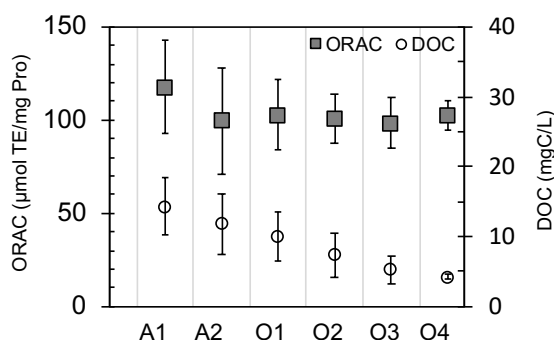


図3 各槽内のDOC濃度と活性汚泥微生物のORAC

ORAC 値を示したため、抗酸化能をもつ可能性が示された。また、4 つの好気槽での活性汚泥微生物を対象に細胞内の ORAC を分析した結果、その値には大きな変化が見られなかったが、有機物濃度の減少にともないばらつきが収まる傾向が確認できた。つまり、反応槽の有機物濃度は活性汚泥微生物の総抗酸化力を大きく影響することがわかった。

- 5) Cao et al. (1997) *Free Radical Biology and Medicine* 22(5), 749–760.
- 6) Liang (2010) *Chemosphere* 81(5), 626–632.
- 7) Marklund (1982) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79(24), 7634–7638.
- 8) Cabiscol et al. (2000) *International Microbiology* 3(1), 3–8.