

活性汚泥の炭水化物代謝速度の測定方法の開発

金沢大学工学部 正○山本（池本）良子・山本隆・小森友明

1. はじめに

筆者らは、活性汚泥の多糖類貯蔵能力と炭水化物代謝速度を求める方法を開発し、糸状性細菌 *Sphaerotilus natans* の多く増殖した活性汚泥は、正常な活性汚泥と比較して多糖類貯蔵能力が小さく代謝速度が大きいことを報告している。炭水化物代謝速度は、曝気槽混合液全炭水化物の減少速度から求めることができるが、液槽内の炭水化物と汚泥内の炭水化物の和を混合液全炭水化物とした場合、代謝速度の速い活性汚泥では正確な値を得ることができなかった。本研究では、混合液全炭水化物濃度を直接測定する方法について検討した。

2. 炭水化物定量における硫酸の影響

全炭水化物の抽出には細胞の破壊と多糖類の分解に硫酸を用いる必要がある。硫酸の原液を用いた場合汚泥が黒変するため、本研究では H_2SO_4 (4+1) 溶液を用いることとした。グルコース回収率に及ぼす H_2SO_4 (4+1) の影響について検討するために、グルコース標準液に種々の量の H_2SO_4 (4+1) を添加した後アンスロン法により炭水化物の定量を行なった。Fig. 1はアンスロン測定時の試料中の H_2SO_4 (4+1) の混入割合と吸光度の関係を示したものである。 H_2SO_4 (4+1) の混入率50%程度までは H_2SO_4 (4+1) が多く混入すると吸光度が大きく上昇するが、それ以上の混入では逆に低下することがわかる。グルコース標準液に H_2SO_4 (4+1) を添加して、その1mLを採取してアンスロン測定を行ったもの(A)と、分析時10倍に希釈したもの(B)の吸光度の上昇率が等しいことから、グルコースが H_2SO_4 (4+1) の添加により変化するのではなくアンスロン測定の際に試料中に H_2SO_4 (4+1) が混入したために吸光度が上昇したと考えられる。また、 H_2SO_4 (4+1) が0.5%程度含まれるだけでも吸光度が上昇する傾向が認められたことより、炭水化物の定量には H_2SO_4 (4+1) の影響を補正することとした。

3. 最適添加硫酸量の決定

MLSS 1,000~2,000mg/Lの活性汚泥を用い、曝気槽混合液 5 mL に対して種々の量の H_2SO_4 (4+1) を添加して分解した後に炭水化物の定量を行なった。Fig. 2は H_2SO_4 (4+1) 添加量と抽出された炭水化物濃度の関係を示したものである。実験1および実験2では、炭水化物は液相に残存しており、細胞内の炭水化物濃度は低かった。このような場合には H_2SO_4 (4+1) の添加量はあまり影響ないことがわかる。その他の実験では細胞内に十分に炭水化物を蓄積した汚泥について分析を行っている。この場合、汚泥

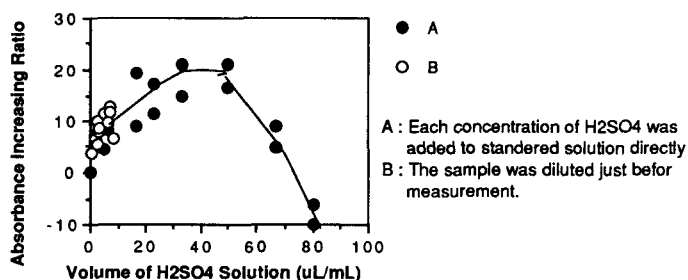


Fig. 1 Relationship between the volume of H_2SO_4 (4+1) solution contained in 1 ml of anthrone measurement sample and increasing ratio of absorbance to normal conditions.

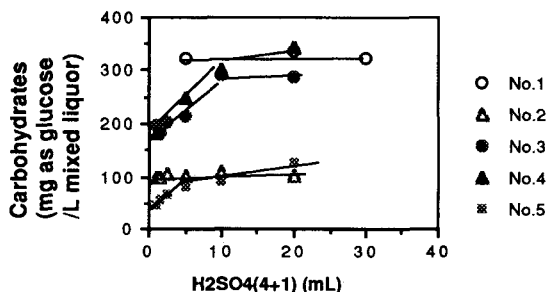


Fig. 2 Relationship between the volume of H_2SO_4 (4+1) solution added to 5 ml of mixed liquor and the recovered carbohydrate concentration in the direct extraction method of total carbohydrates in the mixed liquor.

混合液 5mL に対し 5mL の H_2SO_4 (4+1) では不十分であり、10mL 以上の H_2SO_4 (4+1) が必要であることがわかる。 H_2SO_4 (4+1) の添加は最小限が望ましいので本研究では汚泥混合液 5mL に対し 10mL の H_2SO_4 (4+1) を添加して測定することとした。

4. 従来法との比較

次に、遠心分離により液相と汚泥を分離して測定する従来の測定方法の場合の H_2SO_4 (4+1) の添加量について検討を行なった。曝気槽混合液 20mL を遠心分離して得た汚泥に 2.5、5 および 10mL の H_2SO_4 (4+1) を添加し、全量を 100mL として超音波で分散させた後炭水化物の定量を行った。液相についても $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターによって濾過した後、分析を行った。別に同汚泥について、前述の直接測定法により混合液全炭水化物の分析を行った。Table 1 はその結果を示したものである。添加する硫酸の量に関わらず抽出量は一定であることがわかる。従来どおり 5mL の H_2SO_4 (4+1) を用いれば汚泥濃度の変化にも対応できると考えられる。また、汚泥内全炭水化物濃度に液相炭水化物濃度を加えた混合液全炭水化物濃度と、直接混合液を抽出して求めた全炭水化物濃度は、液相に殆ど炭水化物が残存していない本実験条件ではほぼ一致していた。

最後に種々の条件での 2 つの実験方法で得た炭水化物濃度の比較を行うために、簡単な基質除去試験を行った。用いた汚泥はグルコースとペプトンを主体とする人工廃水で馴養した汚泥であり、グルコースペプトン基質を添加して経時的に液相炭水化物、汚泥内全炭水化物および混合液全炭水化物の分析を行った。Fig. 3 はその結果を示したものである。本方法によって直接求めた混合液全炭水化物濃度 (●) は汚泥内全炭水化物濃度に液相炭水化物濃度を加えた値 (○) と有為な差は認められなかった。このことは、両者の抽出においてほぼ同じ炭水化物を抽出しており、どちらの方法も有効であることを示すものである。初期において、直接測定値の方が加算値よりも幾分大きく評価されているが、これは液相炭水化物の抽出操作中のロスによるものと考えられるので、操作を出来るだけ速く行う必要がある。炭水化物代謝速度は混合液全炭水化物の減少速度から求めることができる。混合液全炭水化物を直接求める方法では、試料採取後直ちに硫酸を添加することにより、時間的ロスがなくなるため、正確な炭水化物代謝速度を求めることができるであろう。

4. まとめ

(1) 汚泥の分解に硫酸を用いる場合、アンスロン法の測定値に影響があるので補正する必要がある。(2) 曝気槽混合液内全炭水化物は混合液 5mL に H_2SO_4 (4+1) 10mL を添加する方法で求めることができた。(3) 液相炭水化物と汚泥内全炭水化物を分けて測定する従来法の硫酸の添加量は妥当であった。(4) 両方法ではほぼ同量の炭水化物を抽出することができるが、炭水化物代謝速度を得るためには直接測定の方が正確な値を得ることができる。

Table 1 Extracted carbohydrate in the mixed liquor using the separate extraction method in the three conditions and that using the direct extraction method.

Separate extraction method using 20 mL of activated sludge

H_2SO_4 (4+1) added	Total carbohydrates in the sludge the liquid phase extracted Carbohydrate	Carbohydrates in the mixed liquor	Total carbohydrate
2.5 mL	128.7	2.2	130.9
5.0 mL	128.0		130.2
10 mL	128.3		130.5

Direct extraction method using 5.0 mL of activated sludge mixed liquor

130.6

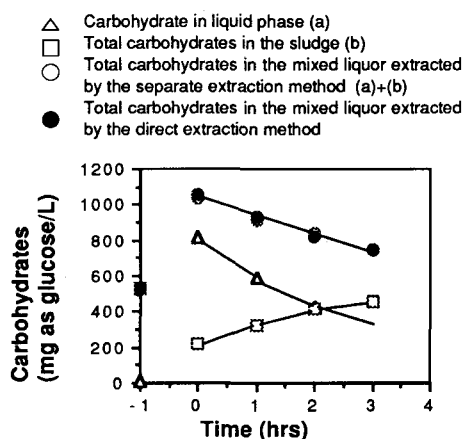


Fig. 3 Time course of total carbohydrates in the mixed liquor extracted by the direct extraction method and that by the separate extraction method when the substrate made up of glucose and peptone was added to the activated sludge.