

大阪工業大学大学院 学生会員 ○ 孫 晋
 大阪工業大学 正 会 員 古崎 康哲
 大阪工業大学 正 会 員 石川 宗孝

1. はじめに

活性汚泥微生物細胞内に存在する NADH(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を計測して活性状態を推測し、制御に応用する手法が注目されつつある。生物体内に存在する NADH は波長 370nm の光を吸収し、450nm 付近の蛍光を発する特性¹⁾を利用して定量することができる。一方、活性汚泥を超音波照射してその一部分を死滅(不活性化)させることで再基質化させて反応槽へ返送し、そこで生分解させることにより、余剰汚泥を削減する手法が報告されている²⁾。本法では再基質化処理において、どれだけ死滅させたかを把握することが重要となる。本研究ではこれを、微生物細胞の破碎に伴って漏出した細胞質中の NADH を測定することで把握できないか検討した。NADH の測定は反応槽混合液に対して行うのが一般的であるが、活性汚泥の SS 分(細胞内)、ろ液(細胞外)に分画することができれば、よりの確な評価が可能になると考えられる。本研究では活性汚泥の細胞内および細胞外 NADH の測定手法を提案するとともに、超音波を用いた再基質化処理への応用が可能かを検討した。

2. 実験および NADH の測定方法

(1)細胞外液および内液の NADH 測定

図-1 に細胞内、外液および原液の NADH 測定方法を示す。細胞外液の定義は 1 μ m ガラス繊維ろ紙(アドバンテック,GS-25)を通過する成分とし、通過できない懸濁成分の抽出液を細胞内液とした。活性汚泥のろ液(細胞外液)、汚泥(SS 分)を捕捉したろ紙(細胞内液) およびろ過前の原液に対して、Tris-HCL(pH7.75)の加熱抽出法³⁾を行い、処理液をろ過し、蛍光分光光度計(日本分光 FP-6200)で測定した。

(2)超音波照射による活性汚泥の再基質化処理

古崎ら²⁾は超音波照射による汚泥活性の低下を ATP で評価している。これを NADH でも同様に評価可能かどうか検討した。超音波による再基質化は、MLSS 濃度 10,000mg/L の汚泥 100mL に対し、超音波装置((有)

日本精機製超音波ホモジナイザー、振動子: 36 ϕ 、周波数:20kHz、出力:150W) により行った。対象となる活性汚泥は、グルコース、グルタミン酸ナトリウム、酢酸アンモニウムを主成分とする人工下水により培養した。

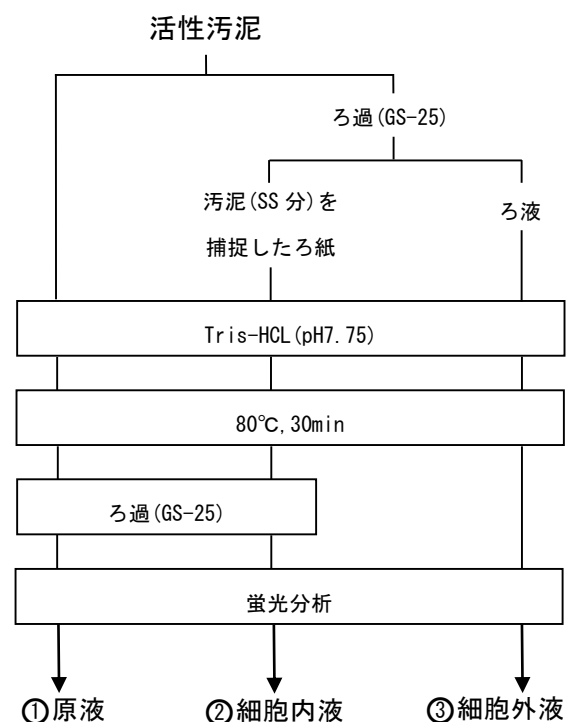


図-1 細胞内、外液および原液の NADH 測定

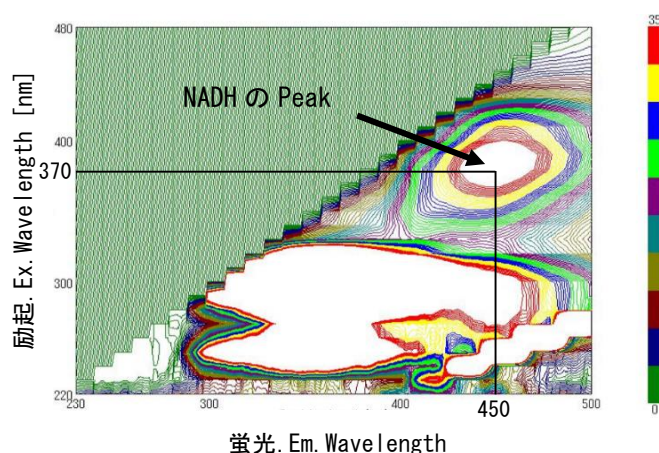


図-2 活性汚泥原液の NADH 三次元スペクトル

3. 実験結果および考察

(1) 活性汚泥中 NADH の分画測定方法の評価

図-2 に原液の三次元スペクトルを示す。励起波長 370nm/蛍光波長 450nm 付近にピークがあり、300～400nm の大きなピークからは独立している。他の物質による干渉は少なく、はっきり認識できる。図-3 に 15 分照射後の細胞外の三次元スペクトルを示す。同じようにピークとして認識できた。このことから NADH のピークは他の物質に干渉されず、比較的信頼できる数値が得られると考えられる。

図-4 に NADH について、活性汚泥原液、ろ液と汚泥(SS 分)別々に測定した分画値、超音波照射後の分画値を示す。原液は 102 $\mu\text{mol/L}$ 、ろ液(細胞外液)の NADH 濃度は 16 $\mu\text{mol/L}$ 、SS 分は 86 $\mu\text{mol/L}$ であり、ろ液と SS 分の和は原液の NADH 値と一致した。次に、超音波を 15 分当てた汚泥についてはろ液と SS 分の NADH 濃度は 34, 69 $\mu\text{mol/L}$ であり、その和も原液の値とほぼ一致した。このことから活性汚泥の SS 分(細胞内)とろ液(細胞外)の分画評価が可能であることが分かった。また、NADH 測定操作が繁雑である細胞内 NADH は原液から細胞外液(ろ液の NADH)を引いた値を使用することも可能である。

(2) NADH を用いた超音波による汚泥不活性化の評価

図-5 に活性汚泥に対する超音波の照射時間 5, 15, 25min における細胞内 NADH 蛍光特性を示す。照射時間を増やすと同じ形でピーク全体が小さくなったことから、NADH が減っていると考えられる。図-6 に超音波処理時間と細胞内に存在する NADH, ATP の変化率を示す。ここで ATP の値は、超音波照射時間が長い方が汚泥の死滅(再基質化)が進んでいることを示す。超音波照射により再基質化された汚泥は照射前と較べて NADH 濃度が減少し、照射時間が長いほど小さくなることがわかった。処理前(NADH 130 $\mu\text{mol/L}$)と比べた減少率は、照射時間 5, 15, 25min においてそれぞれ 16, 35, 44%であった。この値は、ATP の測定結果と似た傾向であった。このことから、NADH は細胞の生死判定の指標として、再基質化処理において ATP に替わる指標として使えると考えられる。

4. おわりに

NADH の測定において、活性汚泥の SS 分(細胞内)とろ液(細胞外)の分画評価が可能であることが分かった。このことは NADH による汚泥活性の評価をよりの確にすること

ができる知見と考えられる。NADH は細胞の生死判定の指標として、再基質化処理の評価に使える指標であると考えられる。

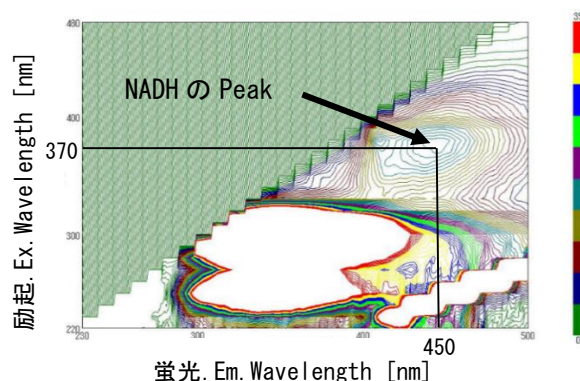


図-3 超音波を 15 分当てた汚泥の細胞外 NADH 三次元スペクトル

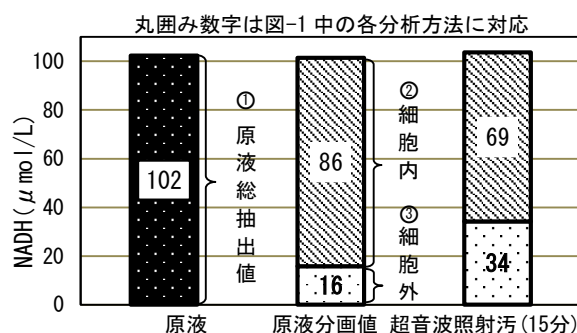


図-4 活性汚泥の細胞内、外 NADH

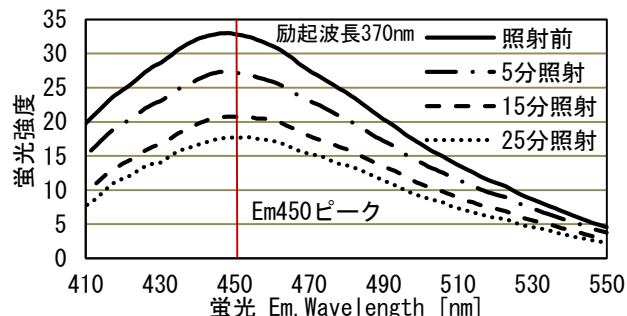


図-5 超音波照射による細胞内 NADH 蛍光特性の変化

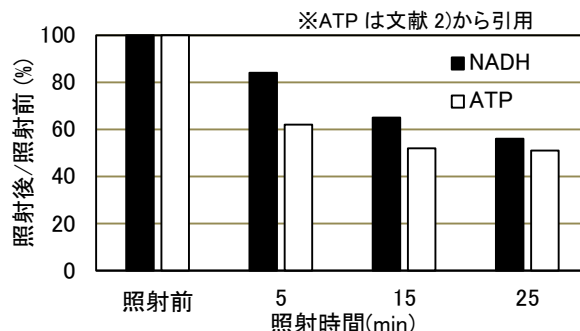


図-6 超音波照射による活性汚泥(細胞内) NADH, ATP の変化率

<参考文献>

- 1) T. Scheper, et al .Analytica Chimica Acta, Vol.400, pp.121~134 (1999)
- 2) 古崎ら, 環境工学環境論文集, Vol.43, pp.411~416 (2006)
- 3) 王 晶ら, 微生物学通報, Vol.36, No.5, pp.773~779 (2009)