

脱窒処理生物膜の代謝産物と細胞外ポリマーの凝集性

呉工業高等専門学校 正員 大橋晶良
 アジア工科大学 正員 原田秀樹
 長岡技術科学大学 正員 桃井清至
 建設省中国地方建設局 正員 ○横田仁明

1. はじめに

生物膜型下・廃水処理装置の処理性能を予測・評価するためには、反応器内の生物膜量の把握が必要である。また、活性汚泥法下水処理場においてはバルキング対策を確立する必要がある。しかしながら、フロック形成や生物膜付着形成機構の知見が乏しいために、これらの問題を解決するまでには至っていない。そこで、本研究は生物膜の付着形成機構の解明を目的として、平板上に形成させた脱窒処理生物膜の代謝産物と細胞外ポリマーの凝集試験等を行い、細胞間の付着機構について検討を行ったものである。

2. 実験方法

生物膜は、図-1に示す水路(100×20×30 cm)の底面に設置してある支持板(透明の硬質塩化ビニール板、5×10cm)上に形成・生長させた。流量は20 l/min、水深は27.3mmである。基質は脱窒生物膜を対象としているため、硝酸ナトリウムとメタノールの人工下水を用い、基質タンク内の濃度をそれぞれ500mg-N/l、1500 mg/lとし、若干の無機塩類が添加してある。また、りん酸緩衝液(イオン強度0.01)でpHを7に、水温は25℃に保っている。生物膜が付着した支持板(以降、初期設置板と称す)を約1週間間隔で1枚ずつ取り出し、基質700mlが入っているプラスチック製

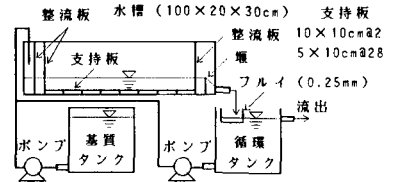


図-1 実験装置の概略図

表-1 バルク液の凝集性に及ぼす基質濃度の影響

静置20分後のバランク濁度(mg/l)	硝酸性窒素		無機塩(濃度)	
	なし	あり	1/100	1/10
312	130	18.7	41.3	36.0
			28.5	23.5

容器に1枚浸水させる。窒素パッキを行った後、水温を25℃に保った状態で26時間経過させた後のバルク液を濾過(TOYO製ガラスファイバー濾紙 GA100)する。その後、支持板上の生物膜を剥ぎ取り、生物膜量の測定および水蒸気抽出法による細胞外ポリマーの抽出を行った。取り出した支持板は水路内に戻し、実験終了日に再び取り出した(以降、中途設置板と称す)。このバルク液と細胞外ポリマーについて以下の試験を行った。

① 凝集試験…試験管にバルク液または細胞外ポリマー10mlとカオリン(1000mg/l)10mlを入れて攪拌し、その懸濁液を20分～20時間静置した後の上層5mlの濁度(バルク液のみ)と沈殿量を測定した。なお、バルク液にはCaCl₂(5mM)、細胞外ポリマーにはHCl(1N 1ml)が添加してある。凝集性を数量的に表すために次式の凝集率を定義した。

$$\text{凝集率} = \frac{\text{懸濁液の濁度} - \text{静置20分後の上層5mlの濁度}}{\text{懸濁液の濁度}}$$

② ゲルクロマトグラフィ分画…バイオゲル P-200(カラム2×50cm)及びセファデックスG-15(カラム2.5×90cm)(バルク液のみ)による分画(それぞれ1フラクション7ml, 10ml)を行い、吸光度(220, 254, 280 nm)測定及び凝集試験を行った。押し出し液はNaCl(0.1M)溶液を用いた。

③ 除蛋白処理…トリクロロ酢酸法によって細胞外ポリマーの除蛋白処理を行い、得られた除蛋白された成分と蛋白質成分の凝集試験を行った。

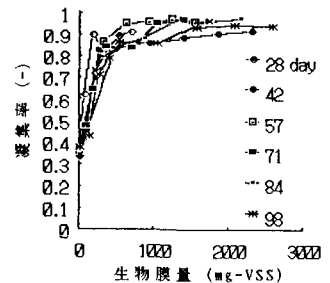


図-2 バルク液凝集試験の凝集率と生物膜量の関係

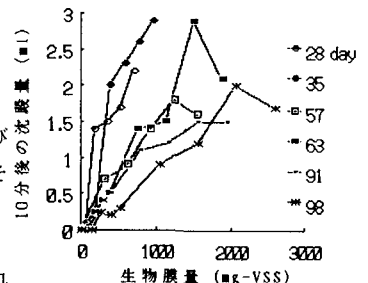


図-3 バルク液凝集試験の沈殿量と生物膜量の関係

3. 実験結果および考察

ホモジナイズされた生物膜にバルク液を添加した懸濁液は凝集性が認められた。一方、バルク液とカオリンの懸濁液は凝集性が認められなかったが、 CaCl_2 を添加することでフロク化し凝集性が認められた。このため、バルク液はカオリンに CaCl_2 を添加して凝集試験を行ったものである。バルク液の凝集性（濁度）に及ぼす基質濃度の影響を表-1に示す。硝酸性窒素は無いより添加した方が濁度は低く、凝集能力が高くなっている。無機塩も同様に無いより添加した方が凝集能力が高く、また濃度が高いほど凝集能力が上がっている。

バルク液の凝集率と生物膜量の関係を図-2に示す。凝集率は経過日数に関係なく、生物膜量によって影響し、700 mg位までは急激な上昇をし、それより多くなればほとんど変化しない。一方、図-3に示す沈殿量では経過日数によって異なり、生物膜が生長していくと生物膜量に対する沈殿量は少なくなっている。バルク液（経過日数91日目）のゲルクロマトグラムを図-4に示す。図が示す様に2つの成分が分画されたが、凝集性があったのは後ろの低分子成分であった。この低分子成分をさらにセファデックスG-15による分画を行った。そのゲルクロマトグラムを図-5に示す。成分量が少ないフラクション No. 23と24で凝集性があり、そのpHは7~8程度であった。以上のことから脱窒生物膜が行う硝酸性呼吸によりバルク液中に放出される代謝産物が凝集性に関与し、また無機塩の存在も大きく関与していると思われる。

細胞外ポリマーとカオリンだけの懸濁液では凝集性が認められなかったが、 HCl を添加すると凝集性を示した。中途設置板の生物膜細胞外ポリマーの凝集試験における沈殿量と静置時間の関係を図-6に示した。細胞外ポリマーの凝集試験では、ゾル状の物質が発現し、これが時間を経るにつれて沈殿物となる形態がみられた。このため、縦軸の沈殿量は沈殿物の体積またはゾル状の体積を表している。経過30日目頃まではゾル状の物質は発現しなかったが、これは初期の頃は生物膜量が少なく、細胞外ポリマー含有量が少なかったためと思われる。静置20時間後の沈殿量と細胞外ポリマー重量の関係を図-7に示した。ポリマー重量が多くなれば沈殿量も多くなっているが、凝集の形態から沈殿量が多ければ凝集能力が高いと考えるより、ゾル状物質の圧密が小さかったことを示している。しかしながら、凝集性はポリマー重量だけでなく、経過日数によっても変化しており、細胞外ポリマーの成分によって変化すると考えられる。

細胞外ポリマーのゲルクロマトグラフィ分画では、2つの成分に分画され、フラクション No. 10付近の高分子成分に凝集性が確認できた。なお、経日変化によってゲルクロマトグラムのパターンが変化しており、高分子成分の変化によって凝集性も左右されると推察される。また、除蛋白された細胞外ポリマー成分では凝集性が認められず、一方蛋白質成分で凝集性がみられた。このことより細胞外ポリマーの凝集には蛋白質成分が強く関係していると思われる。

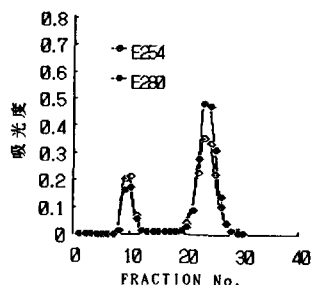


図-4 バルク液 (91日) のバイオゲル P-200によるゲルクロマトグラム

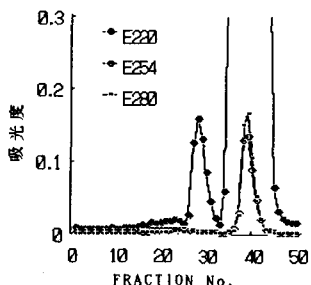


図-5 バルク液 (91日) のバイオゲル P-200によるゲルクロマトグラム凝集成分のセファデックスG-15によるゲルクロマトグラム

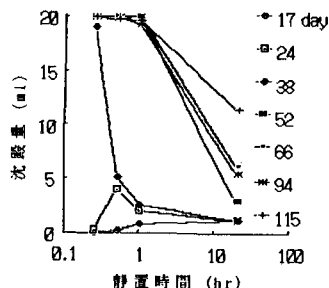


図-6 細胞外ポリマー凝集試験の沈殿量と静置時間の関係

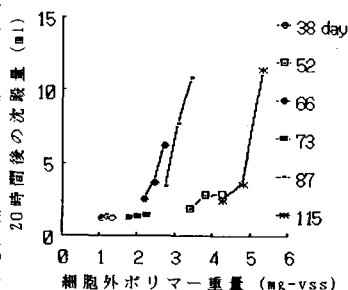


図-7 細胞外ポリマー凝集試験の沈殿量と細胞外ポリマー重量の関係