

PUF付着嫌気性菌の基質消費活性と 細胞外ポリマー量について

九州大学工学研究科 ○学 久場隆広

九州大学工学部 正 古米弘明 正 楠田哲也

1.はじめに 発泡ポリウレタンフォーム(PUF)は立体的な網目構造を有していることから、嫌気性有機性廃水処理槽の微生物付着担体として導入することにより、PUF内部にマクロな生物群の棲み分けが起こり、その結果、処理特性の改善が期待される。また、このような担体を用いた生物膜処理法において、生物の付着メカニズムに関わる重要な物質の一つに細胞外ポリマーがある。従来、様々な方法で細胞外ポリマーの抽出が行われてきたが、厳密に細胞外だけのポリマーが抽出されていない可能性がある。本研究の目的は、グルコース及び混合酸を用いた嫌気性廃水処理実験を行ない、担体の立体網目構造の有無による処理特性を明らかにすることである。また、いくつかの細胞外ポリマーの抽出法を比較し、抽出後の細胞の顕微鏡観察を行なうことによって、その抽出法の妥当性を検討した。

2.実験装置及び実験方法 反応器はアクリル樹脂製で、有効体積1.0Lのものを6器製作した。反応器は全て35℃の恒温室に設置した。浮遊担体として用いたPUFのセル数は13個/25mm、真比重は1.12、見かけ密度0.021g/cm³である。PUFを浮遊状態に維持するために、攪拌翼によりゆるやかに攪拌した(40rpm)。表-1に培養基質組成、表-2にPUF添加条件を示す。培養基質にはグルコースと混合酸(酢酸(HAc)、プロピオン酸(HPr)、酪酸(n-HBu)をCOD比で2:1:1に混合)の2種類を用いた。添加したPUFの形状は、立体構造を有するものとして1×1×1cmと2.5×2.5×1cmのPUFを用い、立体構造のないものとしてはPUFをString状に破碎したものを用いた。植種汚泥には、完全混合槽においてそれぞれの基質で長期間培養された汚泥を用いた。植種汚泥を添加した後、Fill&Draw方式による運転を行なった。容積負荷は各反応器の処理状況に応じて増加させた。実験開始50日目に、HAc、HPr、n-HBuを単一基質とした二種類の基質消費回分実験を行なった。反応器本体を用いたものと、反応槽内の懸濁状態の菌によるバイアルびんを用いた回分実験である。バイアル実験は容積65mLのバイアルを用い、35℃の恒温振とう培養槽内で実験を行なった。

表-1 培養基質組成

有機源 (mg-COD/L)		
混合酸 or グルコース	10000	
酵母エキス (mg/L)	100	
無機塩 (mg/L)		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	700	MgCl ₂ ·6H ₂ O 810
KCl	750	MgSO ₄ ·7H ₂ O 250
NH ₄ Cl	850	CoCl ₂ ·6H ₂ O 18
FeCl ₃ ·6H ₂ O	420	CaCl ₂ ·6H ₂ O 150
緩衝剤 (mg/L)		
NaHCO ₃	4000	K ₂ HPO ₄ 4000

表-2 PUF添加条件

反応器 No.	PUF形状	培養基質
GS	String	グルコース
G1	1×1×1cm	グルコース
G2	2.5×2.5×1cm	グルコース
MS	String	混合酸*
M1	1×1×1cm	混合酸
M2	2.5×2.5×1cm	混合酸

*:HAc:HPr:n-HBu=2:1:1
※:添加体積(見かけ体積)は全て100cm³

3.実験結果及び考察

a) 反応器本体を用いた回分実験 反応器本体を用いたいずれの回分

実験においても、実験開始直後から基質は直線的に減少していたことから、その傾きを基質消費速度として求めた。図-1にその基質消費速度の比較を示す。グルコースで培養された反応器にHAcを添加した場合を除けば、立体構造を有している担体を用いた方が、その基質消費速度が速いことが認められる。特にHPr分解速度には違いが認められ、

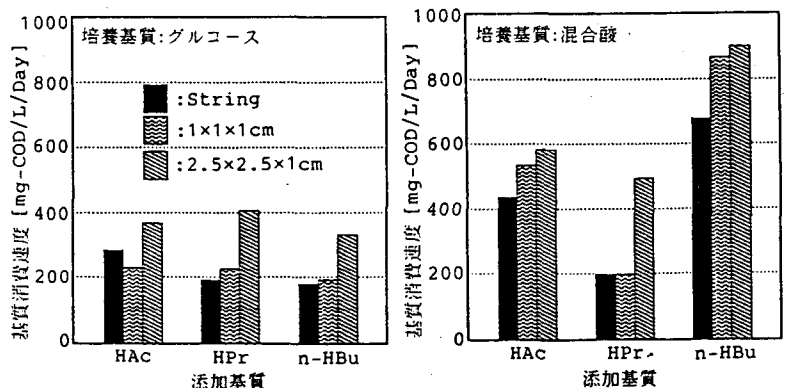


図-1 本体の回分実験における基質消費速度の比較

2.5×2.5×1cmのPUFを添加した反応器(No. G2、M2)において著しくHPr消費速度が速い。この原因としては、HPr分解の進行には、低水素分圧の条件が必要であることと関連していると思われる。即ち、立体網目構造を有するPUFの添加により、HPr分解菌が集積され、更にはPUF内部でのHPr分解菌と水素消費菌の共生により、PUF内部に低水素分圧が維持されて、HPr分解が促進されている可能性がある。

b) 付着菌及び懸濁状態の菌による基質消費 反応器内には付着菌だけでなく、懸濁状態の菌も存在している。この菌による基質消費を評価するために、反応器No. G1、M1内の懸濁状態の菌を、それぞれの代表的な菌であるとして、バイアル実験を行なった。この結果から、懸濁状態の菌の消費速度を求め、反応器本体での速度(図-1)から差引き、PUF付着菌による基質消費速度を計算した。その結果を表-3に示す。反応器No. GSでは基質の9割以上が懸濁状態の菌により消費されているのに対し、No. G2では付着菌により基質の7割以上が消費されている。混合酸培養の反応器においても、2.5×2.5×1cmのPUFを用いた場合に、付着菌による基質消費速度が大きいことがわかる。また、図-1での2.5×2.5×1cmのPUF添加による基質消費速度の増加は付着菌の消費速度の増加を反映しているものと思われる。

c) 細胞外ポリマーの抽出法に関する検討 ①冷却抽出¹⁾、②温水抽出¹⁾、③アルカリ抽出¹⁾、④水蒸気抽出²⁾の4つの方法について、抽出後の細胞の顕微鏡観察と抽出液中の糖濃度の測定を行なった。顕微鏡観察から、冷却抽出は菌の分散が良いことが確認された。温水抽出やアルカリ抽出では分散も悪く、相対的に菌数が少なかった。また、水蒸気抽出では菌はまったく存在しないことが確認された。図-2に抽出液中の糖濃度の比較を示す。温水抽出や水蒸気抽出では糖濃度が高いこと、あるいは顕微鏡による観察結果から、これらの方法では細胞内部の糖も抽出されている可能性がある。アルカリ抽出は分散時間が長いほど糖濃度が高くなるのに対して、冷却抽出は分散時間によらず一定の値を示している。以上のことから、4つの方法の中では冷却抽出が最も良い細胞外ポリマーの抽出法であると思われる。この抽出法を用いて、反応器No. G2、M2のPUF付着菌及び懸濁状態の菌の細胞外ポリマー量を定量した結果を表-4に示す。菌体濃度も同時に示した。グルコースで培養された反応器の付着菌では、タンパク質当たりの細胞外ポリマー量は混合酸で培養された反応器よりも低い、PUFに付着した菌が非常に多いため、反応器内の全ポリマー量としては非常に多いことがわかる。

4. おわりに 本研究から、Stringよりも立体構造を持つPUFの添加により基質消費速度が増加し、特に、HPrの消費速度が増加することが確認された。また、細胞外ポリマー抽出後の細胞の顕微鏡観察や抽出液中の糖分析から、冷却抽出によるポリマー抽出法が良いことがわかった。この方法によりPUF付着菌の細胞外ポリマーを抽出したところ、酸生成菌とメタン菌が共存した系においてポリマー量が多いことが認められた。最後に、本研究は長崎先端技術開発協議会研究助成金の補助によるものであることを付記し、ここに深く謝意を表します。

[参考文献]

- 1) Methods in Microbiology, Vol. 5B, ACADEMIC Press, 1979.
- 2) 大橋、他: 生物膜の生長過程と剥離に関する実験的研究、衛生工学研究論文集、第25巻、1989.

表-3 浮遊菌と付着菌の基質消費速度

反応器 No.	基質消費速度 (mg-COD/L/Day)		
	HAc	HPr	n-HBu
GS 付着	20	---	---
	260	210	300
G1 付着	---	30	---
	260	190	260
G2 付着	280	320	240
	90	70	100
MS 付着	160	40	---
	280	160	860
M1 付着	340	80	180
	190	120	690
M2 付着	420	390	370
	160	110	560

---: マイナス値

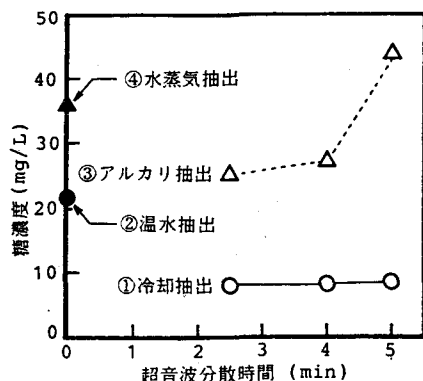


図-2 各細胞外ポリマー抽出法により抽出された糖濃度の比較

表-4 細胞外ポリマー量

	Rea. No. G2		Rea. No. M2	
	付着	懸濁	付着	懸濁
タンパク質濃度 (mg-Protein/ L-reactor)	1320	62	62	130
細胞外ポリマー量 (mg/g-Protein)	19	26	43	9
全細胞外ポリマー量 (mg/L-reactor)	25.0	1.6	2.6	1.2