

単基質への馴致が基質混合によって受ける影響について

東京大学 (学) 岡沢和好

1. はじめに

馴致 (Acclimation) が生物処理に対して重要な意味を持っている、という事実は多くの論文が指摘している。そしてかなりの有機物について、馴致が基質代謝の速度を高めるとか、*lag* を短縮させるとかいう効果を示すことが知られており、^{(1)~(8)} 特定基質への馴致が他の構造的に類似な有機物に似たような効果を示す場合があることも報告されている。^{(5)~(8)} ところが、これらの効果というのは、特定の有機物を単独に代謝させた実験の結果として得られているもので、実際の生物処理ではこの様な単一基質モデルをそのまま応用できるとは考えにくい。

Gandy et al.,⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ Prakasam et al.,⁽¹¹⁾ Stumm-Zollinger,⁽¹²⁾⁽¹³⁾ 金子⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ らは、混合基質を用いた活性汚泥等の実験から、例え細菌が或る基質に馴致してあったとしても、他の基質の存在によってその基質の代謝が阻害される場合があるという事実を指摘した。つまり、或る基質に馴致したということから期待される効果は、この場合一時的に消滅してしまうというわけである。

筆者は、特定基質に馴致したということが、他の基質との混合によってどのような影響を受けるのかという点に着目して、一年以上にわたってモデル実験を行なってきた。ここにその概要を報告し、批判を仰ぎたいと考えている。

なお本研究は活性汚泥処理ということと直接想定せずに、ヘテロジニアスな細菌群による基質代謝という広い立場に立っている。そして初めに細菌懸濁液を用いて実験を行ない、次にヘテロジニアスな細菌群の一例として活性汚泥を用いた実験を行なっているので両者を並列的に記すことにする。

2. 細菌懸濁液による実験

2-1 実験方法

まず細菌懸濁液を用いて混合基質代謝の実験を行なった。細菌は室温において好氣的に培養し (外部との関係は断っていない) 栄養は単一炭素源にグルコースまたは乳酸 $1,000 \text{ mg/l}$, それに $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 500 mg/l , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 50 mg/l , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 3 mg/l , CaCl_2 : 15 mg/l , $1/5 \text{ M} \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4$: 50 ml/l , $1/5 \text{ M} \cdot \text{Na}_2\text{HPO}_4$: $50 \sim 100 \text{ ml/l}$ の割合で蒸留水に加えて培地とした。この培地は、22~26 時間サイクルで取り替えたが、古い培地に懸濁している細菌を遠心 (3500 rpm , 10 min.) した後蒸留水に再懸濁させ、イニシャル細菌濃度が $50 \sim 100 \text{ mg/l}$ となるよう接種を繰り返した。基質への馴致は、ワールブルグ検圧計を用いて逐次 O_2 吸収曲線をトレースし、曲線が一定になるのをまって馴致が完了したと判断した。

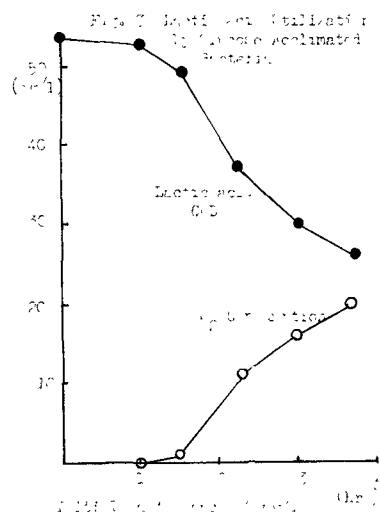
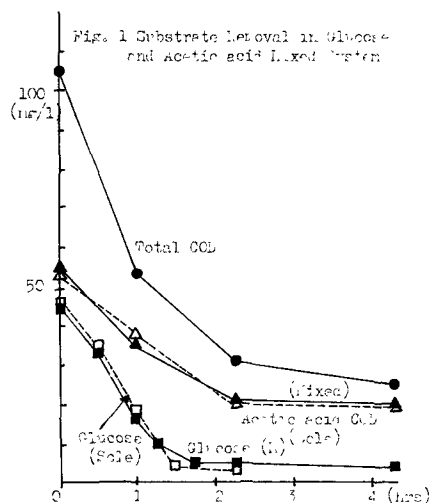
混合基質代謝の実験は、上述のようにして蒸留水に再懸濁させた細菌懸濁液を、さらに 1 回洗滌し (3500 rpm , 10 min.)、 25°C で $30 \sim 60 \text{ min.}$ 空振盪して内生呼吸をコントロールした後に行なった。基質はそれぞれ 50 mg/l 濃度の 2 基質混合系とし、無機塩類を細菌培養液の成分と同比率で加えた。実験は $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ で振盪 $\times 17$ 行ない、一定時間毎に振盪を一時停止させ反応液をサンプリングし

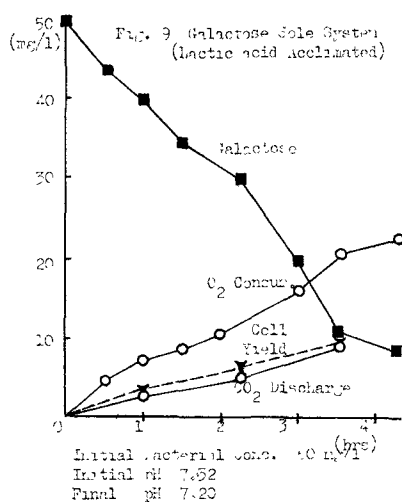
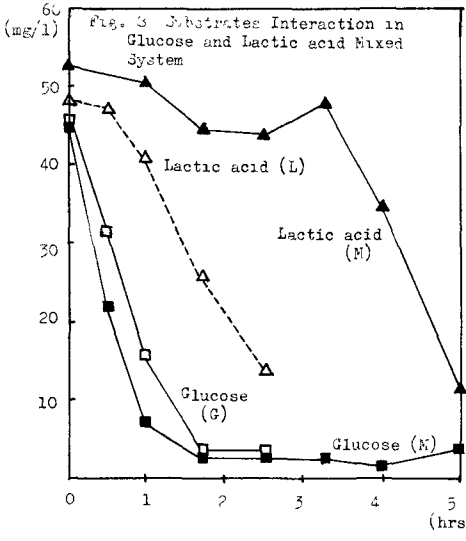
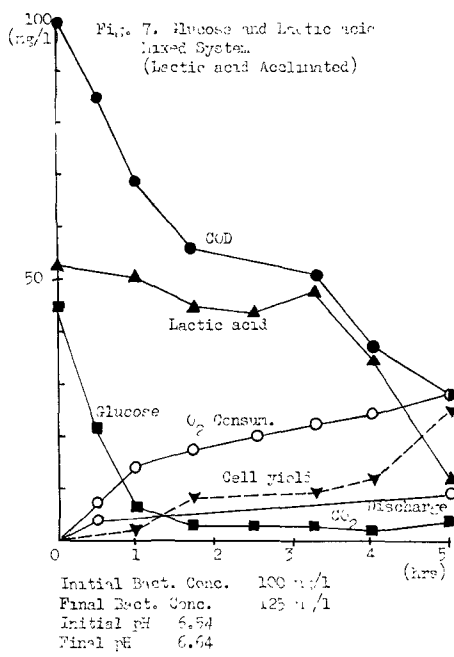
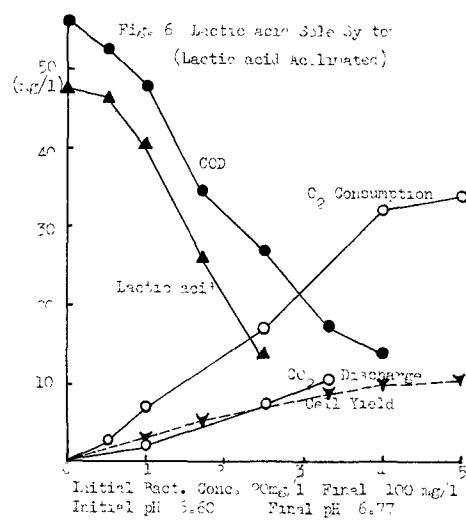
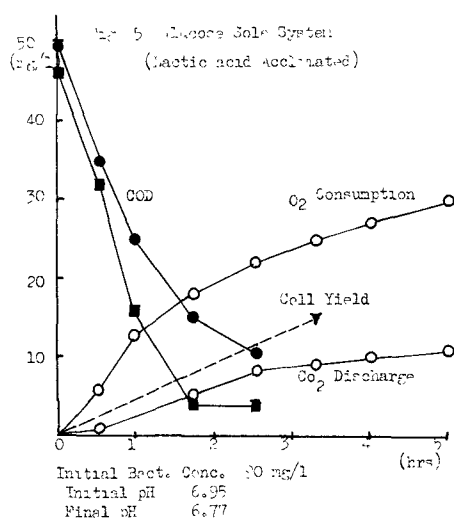
た。これを直ちにミリポアフィルター (HAWP 45) で吸引し、ろ液は一時 5°C 以下で保存し、まとめて分析を行なった。分析項目は総基質濃度 (COD 1/5 法)¹⁶⁾、糖濃度 (アンスロン法)、乳酸濃度 (Barker-Summers 法) である。また *initial* 細菌濃度と *final* 細菌濃度はミリポアフィルターによって定量し、反応中の細菌濃度変化は *optical density* (600 m μ , red filter) でトレースした。ユウに振盪培養と並行して同一試料の O_2 吸収および CO_2 放出曲線をワールブルグ検圧計によって求めた。(CO_2 の吸収は 20% KOH を用いた) なお混合基質利用の実験と同時に、その比較対象として、成分基質の単一基質系における反応を同一条件で実験した。

2-2 実験結果

まずグルコースを単一炭素源として培養した細菌によってグルコース・酢酸の混合基質系における基質混合の影響を実験してみた。(図1) イニシャル細菌濃度は、グルコース系(図中にGで示す)酢酸系(A)グルコース・酢酸混合基質系(M)のいずれも 90 mg/l ($\pm 5\%$ 程度の誤差はある) であった。酢酸を基質として加えた場合、反応液の pH が低下して(グルコースのみでは *initial pH* 6.95, 2時間15分後に 6.32 であるが、酢酸を加えた場合それぞれ 5.02, 4.53 に低下した) 全系の pH を同一に保つことはできなかったが、グルコース除去曲線と比較する限りグルコースは単一基質系でも混合基質系でも等速度で除去されており、pH 低下の影響を含まれて、酢酸の存在によるグルコース代謝への影響はみられない。一方酢酸自体の定量をしてないので、混合基質系における酢酸の COD は総 COD 値からグルコースの COD 値(アンスロン法で定量したグルコース濃度に、グルコースの理論 COD 値 1.07 g/g を乗じて推算した。)を差し引いた残りに等しいとの近似を行なった。この推計法ではグルコースの代謝産物の COD を無視しており、酢酸の COD が実際よりために推定されていることになるが、図1の結果から酢酸の COD 値は単一基質系でも混合基質系でも非常に近い値をとっており、グルコースの存在による酢酸代謝への影響は無いものと判断しうる。

次に乳酸を単一炭素源として培養した細菌懸液を用いてグルコースと乳酸との混合基質系における各基質の除去を検討した。図5はグルコース単一基質系、図6は乳酸単一基質系、図7はグルコース・乳酸混合基質系における反応を示している。乳酸をグルコース馴致細菌によって代謝させた場合は図3に示したような結果が得られており、乳酸が単独に与えられるとすれば乳酸馴致の効果と *Lag* の短縮として認めることができる。しかし混合基質系における乳酸の利用をみてみると乳酸単独(L)の場合に比して、





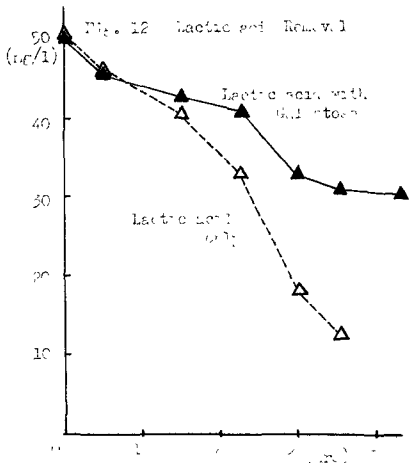
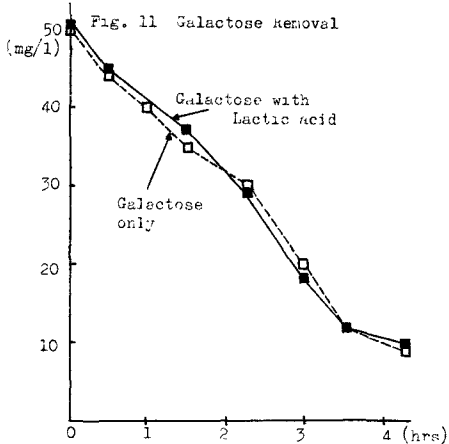
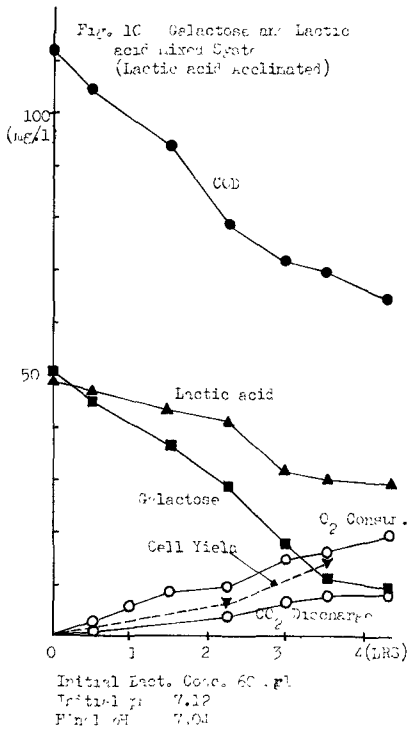
lagが著しく長くなっており(図8)グルコースによる乳酸代謝への阻害が存在していると考えられる。細菌は乳酸に馴致しており乳酸代謝酵素系を備えているはずであるから、グルコースはその酵素活性を *inhibit* しているものと理解されよう。なおグルコースの代謝について、混合基質系(M)の方が単一基質系(G)よりも速い速度で分解されているようにもみえるが(図8)細菌濃度の差によるものであろうと考えている。

次いで同じく乳酸馴致細菌を用いて、ガラクトース・乳酸混合基質系の実験を行なった。図9、図10にガラクトース単一基質系および乳酸・ガラクトース混合基質系の反応を示す。乳酸とガラクトースそれぞれの代謝について、単一基質系と混合基質系とを比較して図示したのが図11、図12であるが、ガラクトースの代謝に関しては乳酸の存在によって何ら影響を与えられないことがわかる。一方乳酸については、混合基質系での利用速度が単独の場合に比べてかなり低下している事実が認められる。グルコースの存在が、乳酸の代謝を完全に *inhibit* していたのに対し、ガラクトースの方は乳酸代謝速度の低下として影響を及ぼすわけであるが、このことは乳酸代謝酵素系に対する *inhibition* が、ガラクトースよりはグルコースの方が強力であるということを示すものであろう。

2-3 考察 I

上記の実験から、乳酸に馴致した細菌を用いて、乳酸はグルコースの存在によってその代謝が阻害されること、すなわちグルコースの存在は乳酸馴致の効果を一時的に消滅させるという結果が得られた。さらにガラクトース・乳酸混合基質系においても、乳酸の代謝はガラクトースの存在によって *inhibit* され、代謝速度の低下が生じるという事実も得られた。このようにグルコースの方がガラクトースよりも阻害力が強いという実験結果は、グルコースによってガラクトース代謝への阻害が生じるという *Stumm-Zollinger*⁽¹²⁾⁽¹³⁾ の出した実験結果ともつながりうると思われる。

ところでこれらの実験において、グルコースに馴致したとか乳酸に馴致してあるということは一体どういう意味を持っていたのだろうか？ 乳酸を単独で利用させた場合についてだけ言えば、*lag*の短縮という現象として確かに乳酸馴致の効果を認めることはできた。(図3、図6参照) しかしながらグルコースの存在によって、そのような効果は一時的に消滅



してしまうわけである。グルコース（あるいはその代謝産物）の濃度がどの程度まで乳酸代謝の阻害をもたらすのかわからないため、グルコースの影響が消えた後に乳酸阻致の効果が復活しているかと判断することはできないが、少なくともグルコースの存在中乳酸阻致の効果は消滅してしまったということである。そしてガラクトースの存在についても同様のことが言える。

並に注目してよいのは、グルコースの利用速度がグルコース、乳酸の何れに阻致した細菌による場合でも全く変わらないという事実であり、(図1, 図5参照) 全ての場合にそうだとは言えないかもしれないが、少なくともこの実験ではグルコースへの阻致はグルコースの代謝にとって特別の意味を持たないように思える。そして阻致効果のある乳酸と阻致効果の無いグルコースという各基質の性質が、グルコースによる乳酸代謝への阻害として現れてくることと、全く無関係ではないという感じを持っている。

3. 活性汚泥微生物による実験

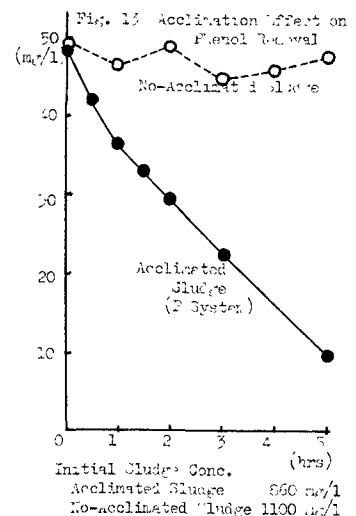
3-1 実験方法

実験に用いた活性汚泥は、フェノールを単一炭素源として室温で連続培養している汚泥である。培養液は水道水 10L に対して、フェノール 5g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5g, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer (pH 6.8) 0.25 mole, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2g で dilution rate を 0.02 /hr 汚泥の引き抜きをしないで運転した。フェノールで連続培養することで、汚泥は勿論フェノールに阻致しており、しかも生理的・生態学的にも定常状態にあると考えられる。

この汚泥を遠心分離 (3000 rpm, 10 min) 及び洗滌 2 回 (図) を行なって水道水に再懸濁させたものをを用いて、混合基質除去の回分試験を行なった。実験した混合基質系は、グルコースとフェノールそれにガラクトースとフェノールである。基質の混合比は initial 濃度でフェノールを 50 mg/l, その他の基質は 100 mg/l としている。無機塩類は水道水に対して $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 mg/l, KH_2PO_4 0.01 mole/l, Na_2HPO_4 0.015 mole/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l の濃度で添加した。initial pH は 6.7~6.9, 反応温度は $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ である。一定時間毎に反応液をサンプリングして直ちにミリポアフィルター (HAWP 45) で吸引ろ過、ろ液は 5°C 以下で保存して基質の分析に用い、ろ紙はそのまま 110°C で乾燥させてスラッジ濃度を測定した。分析方法は、グルコースおよびガラクトースをアンスロン法、フェノールは 4-アミノアンチピリン法を用いた。

3-2 実験結果

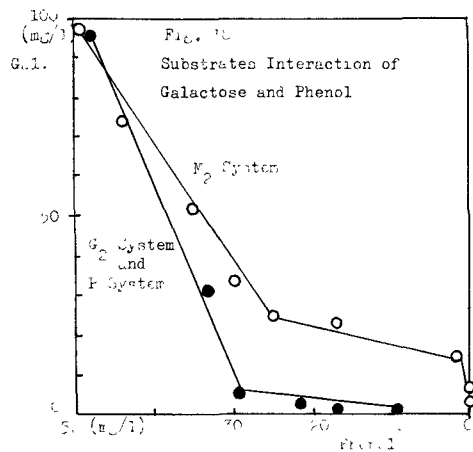
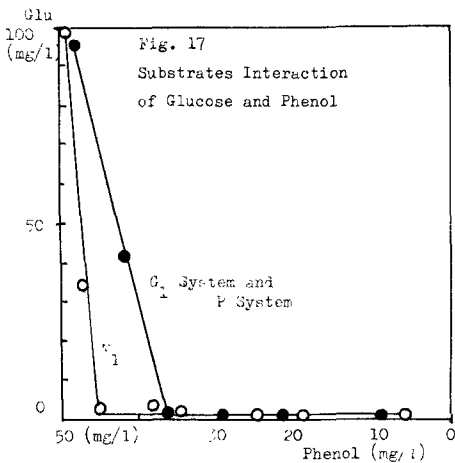
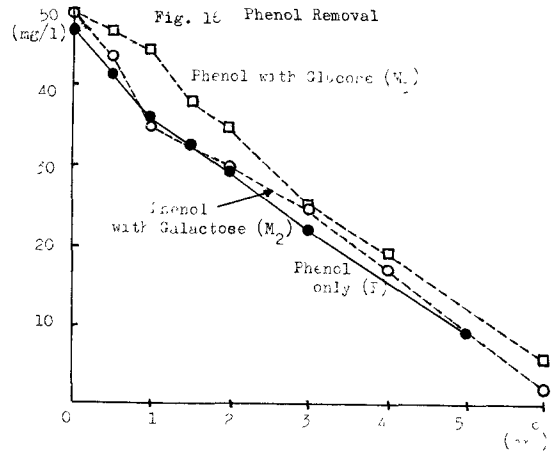
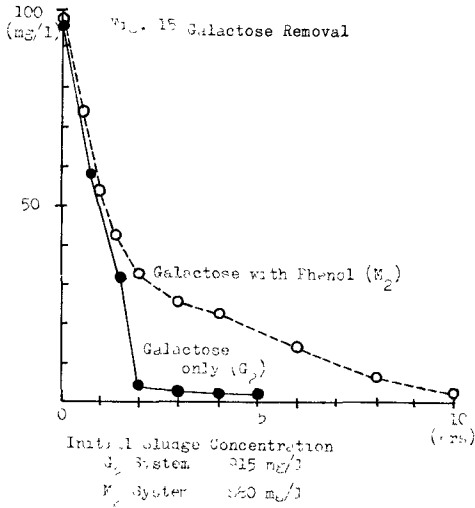
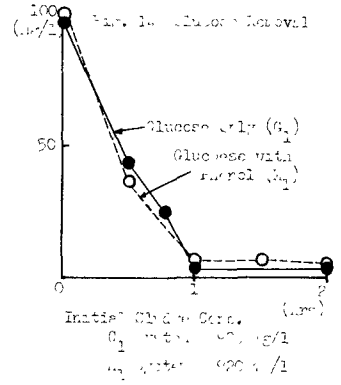
混合基質除去の実験に先だって、フェノールで培養した汚泥の阻致効果を確かめるために、フェノールを単独で与えた場合の除去曲線を阻致してない汚泥 (ミル中で培養) と比較してみた。その結果を図13に示してあるが、非阻致汚泥では5時間の実験中フェノールは全く分解されていないように見える。これに対して阻致汚泥では lag を示さずに除去されており、フェノール阻致の顕



着な効果が存在する。

次にこの汚泥を用いて基質除去の実験を行なった。まずフェノールの存在によるグルコースおよびガラクトース利用への影響であるが、グルコースについては図14に示されているようにフェノール共存の影響を全く受けない。ところがガラクトースの場合、実験の初期には、単一基質系 (G_2) でもフェノールとの混合基質系 (M_2) でもガラクトースの除去速度は余り差がないのに、次第に混合基質系での速度が低下していくことが認められた。(図15) 諸条件は全く同一に設定してあり、これはフェノールの存在によるガラクトース代謝への阻害が生じているものと考えざるを得ない。

ところで、フェノール除去に対するグルコースとガラクトースの影響をみると(図16)ガラクトースが存在することはフェノール利用にとって何ら影響を与えないことが示されている。しかし、グル



コースとの混合基質系 (M_1) においては、特に初期の代謝速度が低下している事実がみられ、グルコースによってフェノール代謝の阻害が生じているものと判断される。グルコースとフェノールの相互作用について、それぞれの基質の濃度変化を、単一基質系における同時経過後の値と、混合基質系における同時刻の濃度を相対的に図示したものを図17として示すが、この図からグルコースがフェノール代謝の阻害をもたらすという事実が容易に理解できよう。(図18は、ガラクトースとフェノールの相互作用を同様の方法で図示したものである) ただグルコースによるフェノール利用への阻害は、グルコースの代謝が終わったとみられる頃(1~1.5時間後)から、その分解速度も単一基質系の場合と差がなくなることからして、グルコース存在時間中の一時的現象であり、馴致効果そのものを消滅させるとかいうものではないらしい。

3-3 考察Ⅱ

フェノール馴致汚泥を用いて行なった実験の結果から、グルコースの存在がフェノールの代謝速度を低下させること、またフェノールは逆にガラクトースの代謝速度を低下させることがわかった。フェノールとグルコースとの関係について、金子⁽¹⁴⁾はフェノール馴致汚泥によるグルコース・フェノール混合基質系の酸素消費量を解析した結果、グルコースによるフェノール利用への阻害があるようだとの報告をしているが、筆者の実験では一応これを確認するような結果が得られた。しかし、その阻害はそれほど強いものではないようである。ただ Eckenfelder et al⁽¹⁵⁾は、グルコース・フェノール・アニリンに同時に馴致した汚泥を用いて、これら基質混合系の基質除去を実験したところ、それぞれの基質は他の基質の影響を受けずに独立して除去されるという結果を得ている。これらの事実から、グルコースが実際の生物処理の際にもフェノール代謝の *inhibitor* となるのかという点については明確に言い切ることはできない。しかしながら、グルコースの存在はフェノール馴致の効果を弱める可能性があることは事実だろう。

またガラクトースの存在はフェノールの利用にとって何も影響を与えないが、逆にフェノールがガラクトース代謝の阻害をもたらすという結果は、ガラクトースが乳酸代謝の *inhibitor* であるという実験結果と併せて考えると興味深いものがある。ただこの場合、ガラクトースに馴致した汚泥による実験を行っていないので、常にフェノールがガラクトース代謝を阻害するというわけではないと思われる。

4. まとめ

生物への馴致が基質代謝に及ぼす影響は、乳酸およびフェノールを単独に分解させた場合、*lag*の短縮や代謝速度の上昇として現われ、従来から言われているような「馴致の効果」を認めることができた。しかし、グルコースの代謝に関しては、グルコースへの馴致効果をフィジカルな現象として捉えることはできなかった。

混合基質を用いて、一方の基質に細菌を馴致したという効果が他基質との混合によって受ける影響の実験では、幾つかの異なる結果が得られた。全く基質混合の影響を受けない場合もあれば、その効果が消滅してしまう場合や、弱められるという場合もある。このような影響は恐らく、生物の側の様々な条件によってその現われ方が異なってくると思われるが、少なくとも馴致効果が十分に発揮さ

れないような場合がありうるということは確かである。生物的に分解が容易でない有機物は、細菌とその有機物に馴致させておかなければ速やかな分解を期待することはできない。しかしまた馴致してあったとしても、他の有機物の存在によって期待された効果が抑制される場合があるという事実は、馴致さえすればどんな有機物も分解できる（従って処理できる）とする考え方が必ずしも正しくはないということを示すものである。

REFERENCES

- 1) Lemb, J. C., III, Wastgarth, W. C., Rogers, J. L. and Vernimmen, A. P. (1964) A Technique for Evaluating the Biological Treatability of Industrial Wastes; J.WPCF, 36, 1263
- 2) 山内太学, 遠矢泰典, 井出哲夫 (1965) フェノール廃液の活性汚泥処理, 用水と廃水, 7, 634
- 3) 左谷正雄, 山口博子 (1965) 工場廃水に含まれる有機薬品の生物酸化の可能性, 下水道協会誌, 2, 11, 20
- 4) Hartman, L. and Singrum, M. E. (1968) Bacterial Adaptation; W.S.W., 115, 289
- 5) Mckinney, R. E. and Tomlinson, H. D. (1965) Metabolism of Aromatic Compounds by Activated sludge; S.I.W., 28, 547
- 6) Rudzack, F. J. and Ettinger, M. B. (1960) Chemical Structures Resistant to Aerobic Biochemical Stabilization; J.WPCF, 32, 1173
- 7) Malaney, G. W. (1960) Oxidative Abilities of Acclimated Sludge; J. WPCF, 32, 1300
- 8) Malaney, G. W. and McKinney, R. E. (1966) Oxidative Abilities of Benzene-Acclimated Activated Sludge; W.S.W., 113, 302
- 9) Gaudy, A. F., Jr., Komolrit, K. and Bhatla, M. N. (1963) Sequential Substrate Removal in Heterogeneous Populations; J.WPCF, 38, 1259
- 10) Komolrit, K. and Gaudy, A. F., Jr. (1966) Substrate Interactions During Shock Loading to Biological Treatment Process; J.WPCF, 38, 1259
- 11) Prakasam, T. B. S. and Dondero, N. C. (1964) Observations on the Behavior of a Microbial Population Adapted to a Synthetic Waste; Proc. 19th Ind. Was. Conf., Purdue Univ., 835
- 12) Stumm-Zollinger, E. (1966) Effects of the Inhibition and Repression on the Utilization of Substrates by Heterogeneous Bacterial Communities; Appl. Microbiol., 14, 654
- 13) Stumm-Zollinger, E. (1968) Substrate Utilization in Heterogeneous Bacterial Communities; J.WPCF, 40, R213
- 14) 金子光美 (1968) 活性汚泥微生物反応における基質相互間の影響, オ7回下水道研究発表会講演集, 250
- 15) 金子光美 (1970) 混合微生物系による基質除去における基質相互間の影響, 水処理技術, 11, 1
- 16) 近藤準子, 山崎康男 (1970) 有機化合物の各種酸素要求量; オ7回下水道研究発表会講演集
- 17) Tischler, L. F. and Eckenfelder, W. W., Jr. (1968) Linear Substrate Removal in the Activated Sludge Process; 4th Intl. Conf. Wat. Poll. Res., Prague, Section II, Paper 4
- 18) Eckenfelder, W. W., Jr. and Tischler, L. F. (1968) Linear Substrate Removal in the Activated Sludge; Water Research, 2, 54