

活性汚泥のタンパク質、核酸の合成およびグリコーゲンの蓄積について

北海道大学 ○ 加藤 善 登
井 上 雄 三

I. はじめに 廃水の生物学的処理において、第一に要求されることは、微生物による有機物の酸化分解、およびこれに共役した合成（貯蔵現象は除く）の両反応速度を高く維持することにある。したがって、従来の多くの研究はこの両反応プロセスにおよぼす外的条件（例えば、DOレベル、攪拌強度 etc）のせいをよつにフリエなされてきた。しかしながら、酸化分解率、汚泥の生成率といった実体的な指標に関する内容をさらに細胞成分の個々の変化まで広げて論議した報告は、多いとはいえない現状にあらう。

演者らは先に、生物活性が菌体内の主として炭水化物の多寡により左右され、しかもその程度は菌体の Age のちがいでさらに異なることを明らかにした¹⁾。これらの活性におよぼす律速要因が何であるかを究明するときは、生物活性の人為的制御という基本点から重要と思われる。

以上の観点から、先ず、生物反応系の基本的因子としての基質濃度、および菌体濃度の変化による細胞成分の変化を静的条件下で調べ、あわせて動的なプロセスでの変化を一部調べた。

II. 実験方法

1. 実験装置 (A) (24Hテスト)； 反応フラスコ(容量300 ml), マノメーター, O_2 曝気装置よりなる「比肉試式」酸素呼吸自動測定装置を用いた。反応液はマグネチックスターラにより 600 rpm で攪拌曝気される。本装置の反応液の K_d 値は容量300 ml の時 130 ppm O_2 / 分である。²⁾ 反応温度 20°C 一定。
(B) (1ヶ月テスト)； 容量30L, 空気量 8L/min, $K_{La}=15.4 \text{ hr}^{-1}$ (Tap Water)

2. 実験に供じた汚泥と基質の組成

Bの曝気装置で24時間サイクル, fill and Draw方式で長期間(約4ヶ月), 合成培地で培養馴化した家庭下水起源の汚泥を用いた。合成培地は、グルコース + NH_4Cl 系に1% 酸 Buffer を加えたものである。馴養負荷は約 $0.4 \text{ g Glu/g SS/day}$ で、汚泥濃度は、約 2 g/l としよう毎日引きぬいた。(滞留時間=8日)

3. 分析方法

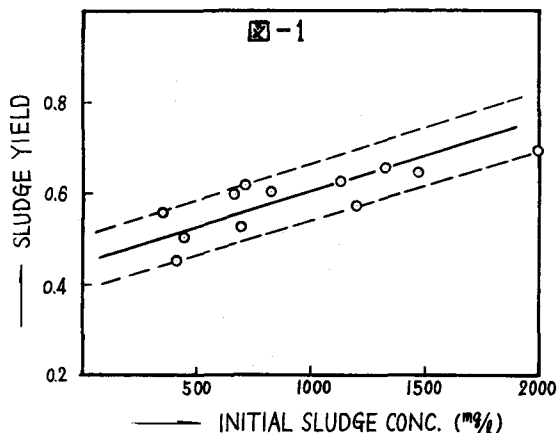
- グリコーゲン (Novick の簡易定量法)； 30% の KOH で汚泥をアルカリ加水分解後、残渣を除くフェノール硫酸法により定量した。炭水化物関係はすべてこのフェノール硫酸法にまつた。
- タンパク質； 1% $NaOH$ でタンパク質を加熱抽出後 Micro Biuret 法¹⁰⁾により定量した。
- 核酸 (DNA+RNA)； STS 変法¹¹⁾にした後、核酸抽出し紫外外部吸収法により定量した。
- NH_4^+ ； ネスラー比色, NO_2^- ； GR 比色, NO_3^- ； フェノールジアシルホニ酸比色。
Total-N； ユルタール (セリフ) 法。

III. 実験結果

(A) 本実験では、汚泥濃度 370 ~ 2000 mg/l の範囲、グルコース濃度 330 ~ 2000 mg/l の範囲で行った。1シリーズ毎に5段階の負荷を設定し、24h 反応後直ちに分析に供じた。

1. 基質の酸化分解率、汚泥生成率におよぼす F/M 比、初期汚泥濃度のとらえよう。

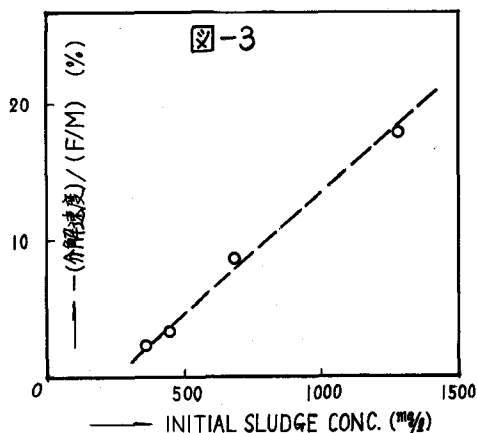
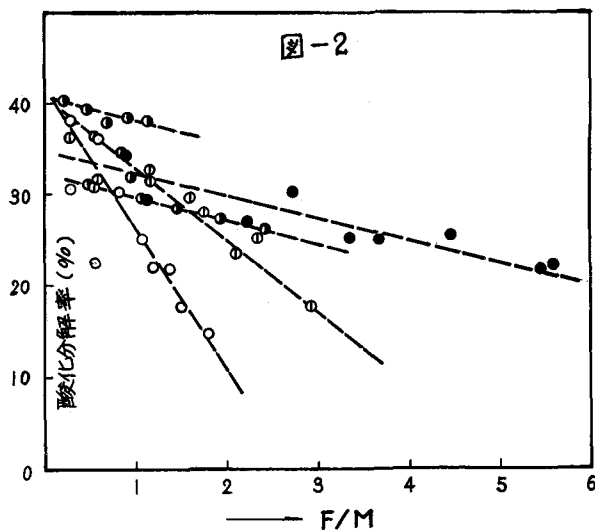
汚泥濃度のとらえようについては、Gaudy²⁾らがグルコース系で行った実験で、初期汚泥濃度が約 300 mg/l から 5000 mg/l に増加した時、分解率が 30% から 5% まで低下し、また汚泥の生成率は 48 ~ 82 % の間で変化したことを報告している。本実験結果では、図-1 に示すように、初期汚泥濃度の大きい時程、生成率が大きくなっていく傾向にある。分解率については、F/M 比と初期汚泥濃度の両方に大きく関係し、両因子ともに大きい場合程、酸化分解率、即ち呼吸量が低下することから明らかになった。



この酸化分解率の低下の程度は、初期汚泥濃度が 300 mg/l 以上で、単位 F/M あたりの分解率の低下の割合が、初期汚泥濃度に比例的であり、これから単位汚泥あたり、単位 F/M あたりの分解率の低下の割合を計算すると、約 16 % / (F/M) / g SS という値が得られた。(図-2 から、初期汚泥濃度の各グループ毎に、平均的な低下率を計算しプロットしたのが 図-3 である。) 汚泥濃度 300 mg/l 以下においては、この酸化分解率の低下は無視してもよい程度と思われる。

汚泥の生成率と分解率の関係をみると、生成率の方は、基質の分解率程、初期汚泥濃度あるいは、負荷のとりようを受けではない。このことより、基質の分解によって得られたエネルギーの利用の仕方、即ち、生合成エネルギーの転位の仕方が異なり、細胞成分の組成変化が予想される。図-2 で示した結果をひきおこす原因が何であるかが問題であるが、主として次の二つが考えられる。即ち DO レベルと、系に加えられる撹拌エネルギーである。DO レベルについては、本装置の K_{La} が 130 mg/l O₂/h であり、どの程度の汚泥濃度まで可能かという問題になる。いま最大呼吸速度を約 100 mg O₂/g SS/h とすると、およそ 1200 mg/l の汚泥濃度以下では DO レベルは問題とならないと思われる。

撹拌エネルギーの問題については、今後検討を加える問題であると考へておける。



2. タンパク質合成について.

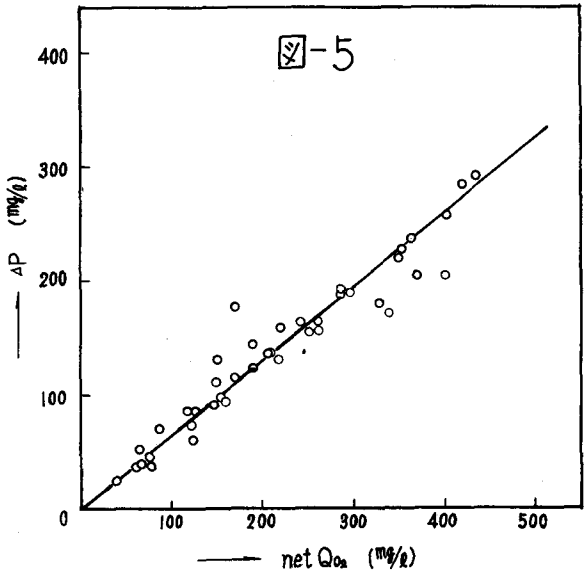
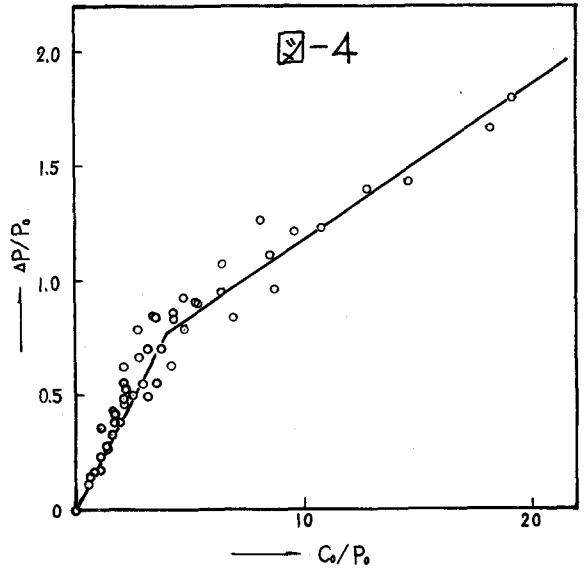
前述したように、 F/H が大きい場合、基質分解率が低下し、したがって得られるエネルギー量が小さくなり、生合成エネルギーの大部分は核酸とかタンパク質等の生体高分子物質の合成が抑制されることが予想される。

負荷量（汚泥タンパクあたり）と、タンパク合成率との関係を図-4に示す。初期タンパク量あたりの添加基質量 (G/P_0) が 4 以下では、初期基質量にほぼ比例してタンパクの合成が行われていくことがわかる。この合成率は約 22 % と計算される。 G/P_0 値が 4 以上の領域では、 G/P_0 値、即ち負荷の大きくなるにしたがい、タンパク質の合成率が低下し、 $G/P_0 = 20$ のヒョウコースの約 9 % しかタンパク合成に使われていないことになる。この Critical G/P_0 値を F/H で表わすと、約 1.2 となる。

上記のタンパク質合成率は、基質中の窒素の除去と行うとするときめめて低い値であるが、Micro Biuret 法で測定されるタンパク量はトリペプチド以上のポリペプチドであり、また、(アロリン+ヒドロキシアロリン)残基の多いタンパクであれば、発色が良い。このように理由で、アミノ酸を含めた含窒素化合物の収支の内題は重要であるが、この点については後に述べることにする。

次に O_2 消費量とタンパク合成量との関係であるが、生合成エネルギーの大部分は、

消費 O_2 との関連が強くある一定の関係が成立するはずである。全実験例について、タンパク合成量と net の O_2 消費量とプロットしたのが図-5である。これから両者の間にはほぼ 1:1 の関係が成立し、1 g O_2 の吸収量の結果約 0.67 g のタンパク質が合成されていると計算される。両者の比例関係は、活性汚泥中で行われている諸反応のうち、タンパク質合成反応は、基質分解反応と共役的に行われていることを示していると思われる。したがって、前節で得られた結果と合せて考えるとすれば、タンパク合成率の低下はグルコース分解率の低下と一致し、汚泥濃度が濃い程、また、負荷が大きくなる程、タンパク合成量が低下し、他の合成エネルギーの小さい物質の蓄積反応が進むと思われる。



3. 核酸の合成について

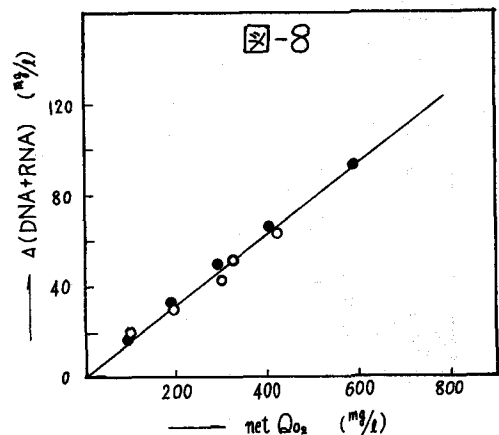
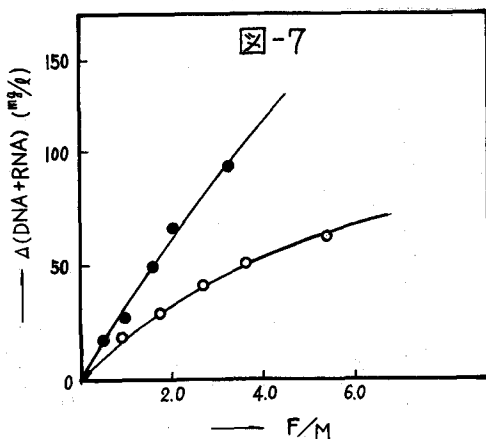
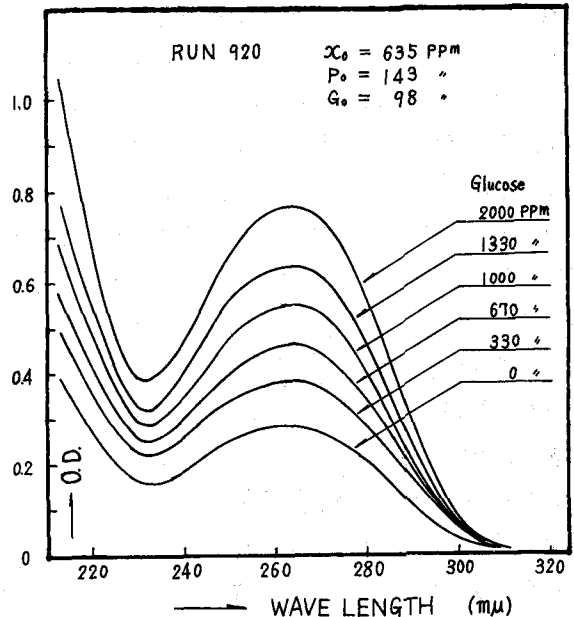
活性汚泥の核酸について、Shephardらが、汚泥消化槽のコントロールにDNA量を指標として使うことを提案し⁸⁾、また Genetelli⁹⁾は、SVIとDNA含量との関連について調べている。本邦では、金子ら¹⁰⁾が、数種の汚泥についてDNA、RNAを定量し、その結果、RNAがVSSに比例して増加し、それとともに O_2 消費速度が高くなること、RNA/DNA比の変動から曝気槽の生物相の変化を予測していること等を報告している。⁹⁾

本報では特にDNA、RNAの分離定量は行わず、全核酸成分についてのその動向を調べた。図-6は、冷酸可溶成分の除去後、5% PCAで加熱分解後5倍希釈して得られた全核酸成分のUV吸収スペクトルで1シリーズの実験例である。図-7には、初期汚泥濃度の異なる2シリーズについてその結果を示した。初期汚泥濃度と、負荷との相互関係により核酸レベルも大きく左右されることがわかる。核酸合成能の小さい汚泥程、負荷が大きくなるにしたがい、核酸の合成が抑制されるが、RUN 920のように、この活性の大きい汚泥では、培地中のグルコース濃度にはほぼ比例して増加した。この場合、添加したグルコースの核酸への合成率は、約5%と計算された。

DNA、RNAの合成にはタンパク質以上にエネルギー供給が必要であると思われ、またタンパク質合成と密接な関係にあるから、netの O_2 消費と核酸合成量は、その活性度の大小にかかわらず、直接比例するであろう。結果を図-8に示した。

この結果と図-5に示した結果から、タンパク量の増加は、核酸の増加量に比例し、この実験に供した汚泥の場合、1gの全核酸の増加は、約3.2gのタンパク量の増加をもたらす。(図-9)

図-6

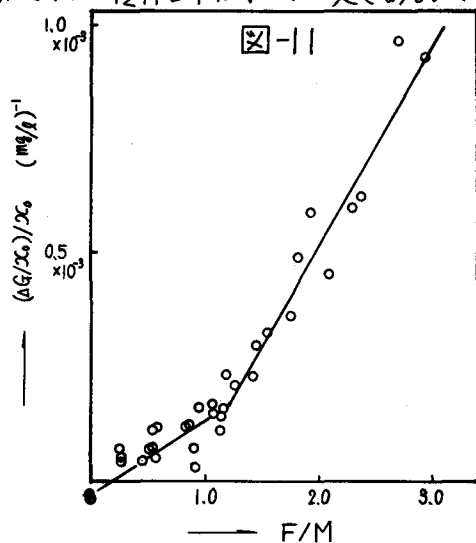
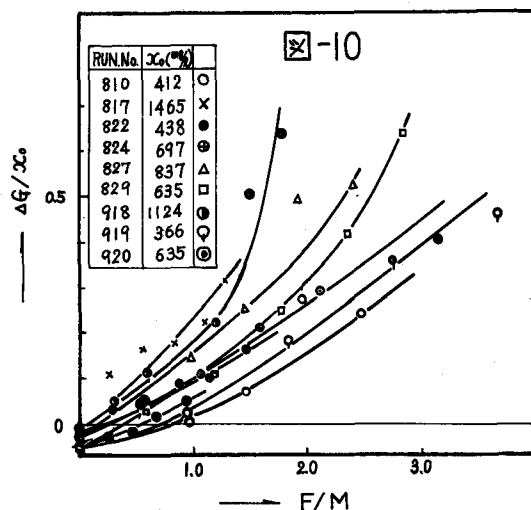
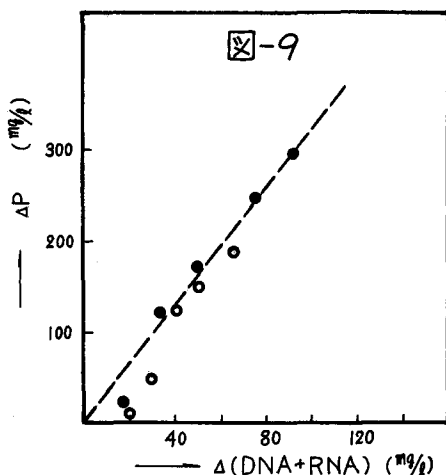


前頁におい、グルコースからの糖重合率は、
 RUN 920 の実験で約5% といいたが、この割合も培養、培
 養条件、特に基質濃度、および菌体濃度により左右され、
 直接的には、呼吸量に依存している。

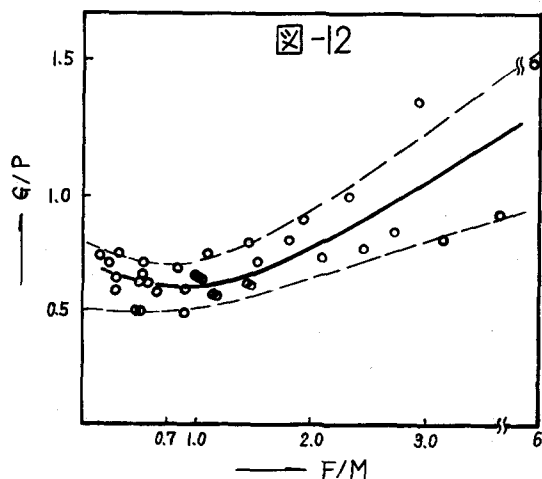
4. グリコーゼンの貯蔵について

微生物のグリコーゼンの合成、蓄積現象については、
Palmitianna 等⁴⁾ が、*E. coli* を使って詳細に研究している。
 また、滝井⁵⁾ は、湖底泥中のグリコーゼンを定量し、
 C/N, C/P 等について検討している。加藤⁶⁾ は、バクテ
 リアプロセスにおいて、基質除去活性の変動が、グリコーゼ
 ンが大部分と思われる泥の炭水化物量の変動と密接な
 関係があり、かつ、呼吸活性の変化がこれに先行する形で対応し、炭水化物の貯蔵による生物活性の
 抑止効果について述べている。すでに述べた様に、糖重合、タンパク質合成、および呼吸量の関係
 は、泥の生成率との関係から、生体高分子物質であるタンパク質、核酸の合成と、他の生体細胞
 成分(多糖類、脂質)の合成は、およそ反対の関係にあることが予想される。

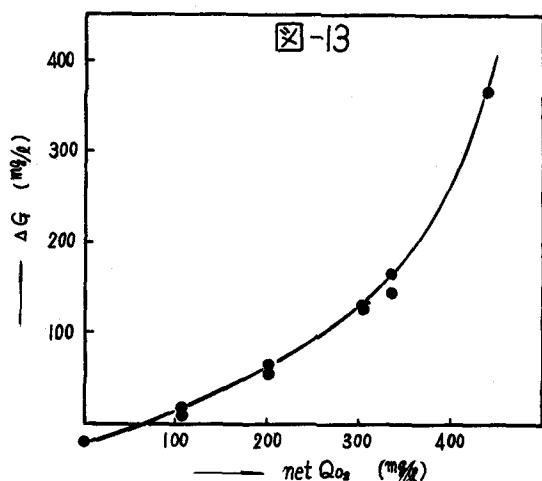
まず、F/M とグリコーゼン合成率の関係であるが、図-10 に示す如く、初期汚泥濃度が高いもの
 は、F/M が大である程、初期SSあたりのグリコーゼン合成率が大きくなる傾向にあり、最初に
 述べた、グルコース分解率におよぼす、F/M、初期汚泥濃度の違いによる傾向と直接関連して
 いる。タンパク質の合成率の場合には、初期汚泥濃度の違いによる傾向はそれほど顕著ではなく、もっ
 ぱら F/M に之よりようされるが、グリコーゼンの場合には、図-10 に示すように、この因子に左右
 される。Gandy 等は、反応系の攪拌エネルギーを大きくすると、汚泥の炭水化物、および SS が
 減少し、タンパク質、DNA、RNA 量はほぼ一定であると述べている。本実験では、スターラの回転数
 :一定、反応液量:一定の条件であるため、反応系に加えられる攪拌エネルギーは一定である。(か



じなから、微生物フロックの個々に加えられるエネルギー量は、生物量に逆比例する。 $Y=2$ 、 $Y=2$ では、撹拌エネルギーの効果を考慮し、図-10に示した結果を、単位汚泥あたりのグリコーゲン合成率を縦軸に整理したのが図-11である。その結果よく整理され図-4で示したタンパク質の合成率に南する傾向と全く反対の傾向を示すことが明らかとなった。変曲点はタンパク質の場合と同じく、負荷(F/M) 1.2あたりにあり、それ以上の負荷では、負荷が高い程、グリコーゲンの蓄積が著しいことがわかる。図-12は、 F/M と24 時間培養後のタンパク質に対するグリコーゲンの比(G/P)をプロットしたものである。タンパク質の合成は、初期汚泥濃度のえいようが著しくなく、グリコーゲンにはえいようするため G/P 値はあがる中々わつ。 F/M が1.0付近以下で G/P 値は約0.6であるが F/M が6倍になると G/P は1.5まで増加した。Walterら²⁾の結果も、ほぼ同じ傾向を示しており F/M が0.8から4.3まで増加すると、タンパク質あたりの汚泥の炭水化物の比が、1.2から2.7まで増加したとしている。ただし F/M 0.8以下の領域での実験は行っていない。



次にグリコーゲン合成量と呼吸量の関係であるが直接の比例関係は認められず、その一例を図-13に示した。これは、グリコーゲン合成が、エネルギー代謝反応と密接的でないことを間接的に示しているものである。



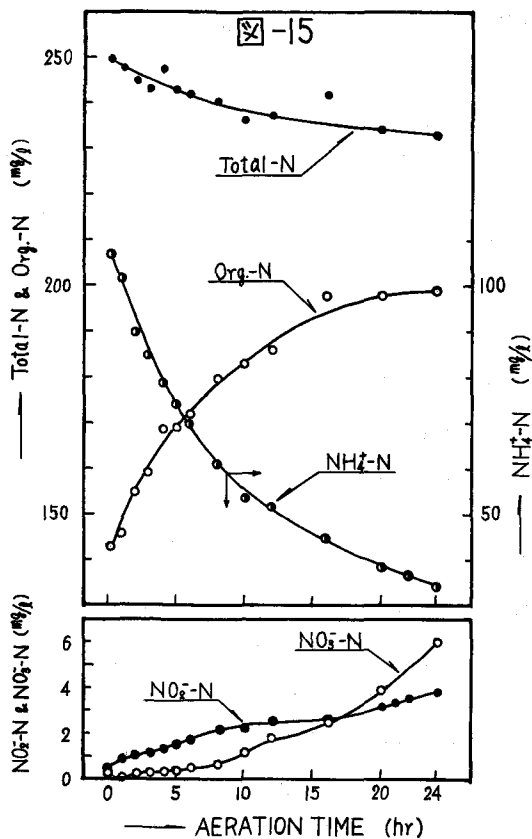
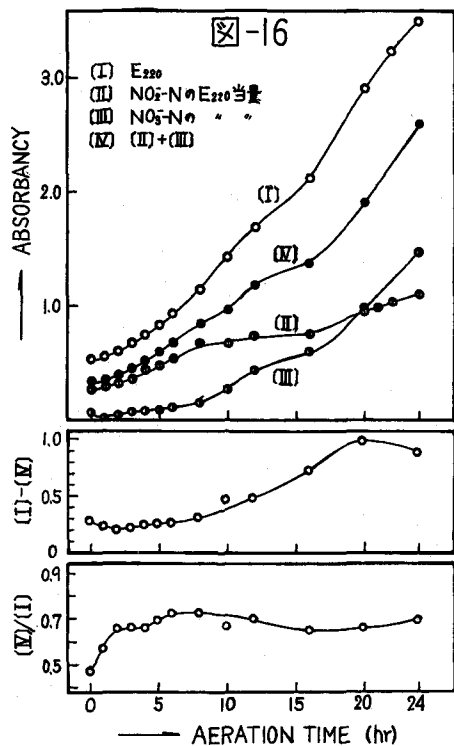
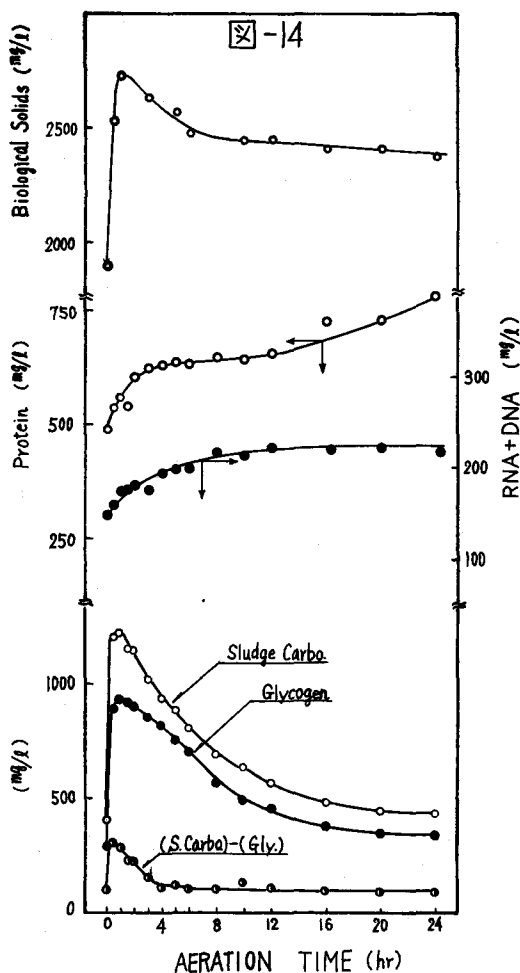
以上述べた結果より、 F/M が1.0付近に組成変化の変化点があり、この点以上の F/M の範囲で、高濃度汚泥、高負荷の条件下、基質分解活性の低下をもち、同時に、核酸、タンパク質の合成が低下、またグリコーゲンの蓄積が促進されるが、全体としてこの汚泥の生死にはそれほど顕著な差は表われないと考えられる。

5. バックアロセスにおけるタンパク質、核酸、グリコーゲンおよびN-化合物の変動

上記の結果は、基質添加24 時間後という静的状態での結果であるため、合成速度あるいは消費速度等に関する考察を安全に行うことはできない。 $Y=2$ で、反応経過にしたがい、各細胞成分がどのように変化し、また生理状態が変っていかをバック実験により調べた。使用した汚泥の性状は次の如くである。初期汚泥濃度:1879(mg/l)、タンパク質:488(mg/l)、核酸:150(mg/l)、グリコーゲン:334(mg/l)

org-N: 154(mg/l), 添加グルコース濃度は、
1000(mg/l)であった。結果を図-14~図-16に示
す。

実験の結果、グルコース除去速度は、
1.19 gr Glucose/gr SS/hr であり、瞬間除去率は、
18.5%であった。残存基質濃度は 50 mg/l (添
加後 20分) まで 0次反応で除去され、その後 50分
まで一次反動的に除去され残存グルコースは、約
3mg/l となった。SS、汚泥の炭水化物、および
グリコーゲン量はこの時点で最大に達し、それぞ
れの除去グルコースに対する生成率は、SS で
82.7%, 汚泥の炭水化物で 81.4%, グリコー
ゲンで 68.8%であった。



蛋白質の合成速度は、初期に最も速く、約5分で合成量がいったんフラットとなり、12分を過ぎる頃から再び合成が盛んになった。しかしながら、有機性窒素は24分まで増加を続け、タンパク質の差がえられる。タンパク質から、タンパク体窒素と有機性窒素の関連をみると、前者は後者の約2と計算され、タンパク質の反応経過による量的変化とあわせて今後検討を要すると思われる。

汚泥の全炭水化物、グリコーゲンについては、8分までの消費速度の変曲点となつてゐる。糖酸は8分まで増加しその後合成が止まり、グリコーゲン消費速度の変曲点とはほぼ同じ時間であった。汚泥の炭水化物のうち、30% KOH でアルカリ加水分解される糖酸は、約20分で最大となり、4分ではほとんど消費された。またグリコーゲンの初期の消費は、汚泥の全炭水化物の消費に比し相対的にゆるやかであった。

NH₄-N の除去パターンは、Org-N の増加と対応しており、24分後の全除去量は75mg/l-N で除去率は68.2%であった。また硝化作用は8分まで亜硝酸菌の増殖がみられ、その後緩慢となりと同時に、硝酸菌の増殖がみられており、全糖酸の合成が止った時点と一致してゐる。

また3波の220mμ の紫外外部吸収値(E₂₂₀)の変化をみたが、時間の経過とともに初期にの上昇率が大きくなり、8分後からはほぼ一定割合の増加を示した。硝酸、亜硝酸イオンも紫外部に吸収があるが、それぞれ1mg/l-N のE₂₂₀は0.25, および0.30であり、これからE₂₂₀の当量値をおよそ全吸収と比較した。全吸収値との差より、紫外部に吸収を持つUnknown物質が溶出する現象が観察され、8分まで、基質添加前の値がほぼ、その後4倍まで増加した。(図-16)

IV おとめ.

呼吸量自動測定装置を使った実験で、初期汚泥濃度、および負荷の之をいかに調へた。その結果、汚泥の生成率は45%から68%まで変化し、初期汚泥濃度が高い程大きく、また、酸化分解率は、両因子に強く左右され両因子とも大まか程、分解率は低下した。タンパク質および全糖酸の合成量は、 ml O_2 と直接比例し、 ml O_2 が1gの時、タンパク質の合成量は0.67g、全糖酸の合成量は0.16gであった。酸化分解率の小さい汚泥程、糖酸、タンパク質の合成量は小さく、いたがってグリコーゲンの蓄積が促進された。高濃度汚泥、高負荷でこのような汚泥が生成される。

1444テストの結果、SS、汚泥の全炭水化物、グリコーゲン、基質が除去されつくされた時点で最大でその後ゆるやかに消費される。タンパク質、糖酸は初期に増加が著しく、前者は5分その後12分から再び増加したが、後者は8分で合成が止り、この時間は、グリコーゲン消費の変曲点、および硝酸菌の増加、培養系への紫外外部吸収物質の溶出のはじまりと一致し、活性汚泥の生理、生態系の変化に關する示唆が得られた。

おわりに 本研究に多大な協力を賜つた、修士課程の関沢一夫君、青井彦君、四年目学生五島清治君、吉川雅幸君に感謝の意を表します。

参考文献 1) 加藤他 9 国下水道研究協会講演集(1972) 2) GAUDY 他 J.W.P.C.F.(1966) 3) WALTER C.F. A.S.C.E. SA. (1968) 4) PALMISTERN; Acta. Chemica. Scand. 10 (1956) 5) 滝井; 水処理生物学会誌 4 (1961) 6) 能谷; 醗酵工學雜誌 50 (1972) 7) 金子; 水処理技術 9 (1968) 8) SHEPARD 他; J.W.P.C.F. 27 (1965) 9) GENETEAU; J.W.P.C.F. 29 (1967) 10) GILL D.M.; Analytical Biochemistry 9 (1964) 11) 水野; 「糖酸の一般的定量法」東京化学会(1969)