

基質除去特性から見た複合基質培養活性汚泥の微生物相

都立大学工学部

正会員

生 方

悠

活性汚泥には種々の微生物が混在している。廃水中の有機物の浄化に直接関与している従属栄養細菌の種類も多数であろう。筆者は、生物学的廃水処理施設の条件下においては、ある有機物は特定の細菌群により利用され他の細菌群には利用されないと考えている。この考え方を基本にすると、そこに構成された活性汚泥の中では有機物除去に直接的に関与している細菌群は約半数を占めているだけで残りの半数の細菌は有機物除去に対しては直接の機能を持っていない、と解釈せざるをえない実験結果が得られた。有機物除去に関与していない細菌群が活性汚泥の中で如何なる役割を果たしているのかは今のところまったく不明であるが、活性汚泥の Population Dynamics を考える上でも重要な情報と判断されたのでここに報告しておく。

1 エネルギー源有機物の分解代謝経路

好気性細菌が有機物を取り込む場合、有機物はエネルギー源有機物と生合成源有機物の2種類の目的で利用される。一方はTCA回路を経由して分解されエネルギー(ATP)を生産するための燃料である。他方は核酸・酵素・細胞膜などの細胞を生合成するための素材である。

好気性細菌がある有機物をエネルギー源として利用できる場合には、(A) 遺伝形質 (B) 馴致 (C) 最大増殖速度 の3つの条件が満たされていることが必要である。

(A) 遺伝形質については特に説明する必要はなからう。Bergey's Manualに記載されている利用可能有機物とはこの遺伝形質の所有を意味している。Pseudomonas cepacia は90種以上の有機物を唯一のエネルギー源として利用できる(1)。その中で20種のアミノ酸は利用できるが、分岐鎖アミノ酸のバリンなど4種のアミノ酸は利用できない。しかしイソ吉草酸などの分岐鎖脂肪酸は利用できるもので、この菌株には分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼを遺伝的に欠いていることが推定される。

(B) エネルギー源有機物を分解代謝する一連の酵素群の多くは、外部基質の存在により誘導・合成される誘導酵素に属している。活性汚泥中にも存在している Arthrobacter globiformis をペプトンならびにペプトン/グルコースで培養した場合、ペプトンで生育した菌は5時間以内にはグルコースをほとんど利用できないが、グルコースを含む培地に生育した菌のグルコースの取り込み能は大きい(2)。この菌のグルコース分解代謝酵素の誘導には5時間以上の時間が必要なのであろう。このように遺伝形質を所有していても、環境条件が整わなければ遺伝形質は表現されない。

活性汚泥細菌は増殖速度が遅いので、異種の有機物を利用できるようになるまでの馴致には時間がかかるものと考えられる。活性汚泥の馴致時間に関する情報は非常に少ない。

(C) 利用できるエネルギー源有機物が複数存在する場合、エネルギー源有機物の分解代謝の経路は複数となるか否かである。最小の酵素量で最大の増殖速度を維持するため、細菌にとって不利益である余分な酵素合成は行われずエネルギー源有機物の分解代謝経路は複数にはならない。グルコース効果がこの例である。E. coli にグルコースとラクトースを投与すると、グルコースが消費された後に初めてラクトースが消費される。ラクトースは数段階の酵素反応を経てグルコースに代謝されるので、グルコースの方が余分な酵素を作らないだけエネルギー効率が高い。ラクトースからみれば中間代謝産物による代謝阻害と考えることもできる。このグルコース効果はグルコースだけに限定された現象ではなく、他の有機物間においても数多く観測され報告されている(3)。この現象は Catabolite repressionとも言われる。したがってTCA回路の代謝中間体やグルコースがこの有機物の代表例となるであろう。しかし下水中にこれらの有機物が多量に存在するとは考えられないので、下水処理に関わる微生物についてはこの現象は無視した方がよからう。

以上はエネルギー源有機物の取り込みについて説明した。エネルギー源有機物の存在下においては、細胞の生合成に必要なアミノ酸・脂肪酸などの多種の生合成源有機物が取り込まれる。この場合細胞内では生合成に必要な酵素系が不用となる分だけ細菌の増殖速度は増加する（グルコースに対してペプトンで 2-3 割）(2)(3)。一般的には生合成源有機物の取り込み量はエネルギー源有機物のそれに対して相対的に小さく、二種の有機物の場合には無視できる程度である。エネルギー源有機物がない場合に、生合成源有機物が単独で取り込まれることはない。それらの有機物が単独で取り込まれる場合はエネルギー源有機物としてである。

以上に記したことを総合すると、活性汚泥法などの生物学的廃水処理法においては処理時間が数時間との限定条件がつくので、処理施設に生育した細菌はエネルギー源として馴致された特定の有機物だけを利用し他の有機物は利用できないこととなる。したがって複数の有機物が除去されている場合には特定の有機物を利用する細菌種が複数存在していることになる。複数の有機物に対して有機物除去の重ね合わせが成立している場合には、異種の有機物をエネルギー源としている細菌群が存在していることはより明らかである。

先に報告した”有機物の分解代謝経路と活性汚泥の基質選択性”(4)において、同一酵素に対する有機物間の競合がある場合には云々としたが、同一酵素とは全ての細菌の代謝経路に存在する酵素ではなく特定の細菌群にのみ特徴的に存在する酵素のことである。したがって、同一酵素＝細菌群と読みかえる必要がある。

2 単独アミノ酸培養活性汚泥の基質除去特性

2.1 実験方法

ペプトンで培養していた活性汚泥を Glu(19), Leu(14), Lys(12), Phe(9), Ala(4) の各アミノ酸で単独培養した。()内の数字はペプトン中の各アミノ酸の含有量を%で表わす。培養期間は Leu, Phe, Ala が4カ月、Glu が3カ月、Lysが 1.5 カ月である。Glu と Lys は活性汚泥の馴致を急ぎ、初期に負荷を上げすぎたため糸状菌が発生していた。有機物除去実験前1カ月の負荷量はすべて 0.2g/g.Mlss・日である。無機塩としてはBOD測定用の補強希釈液を基質添加時に適量加えた。微量金属は週 2-3 回培養溶液を水道水で数回洗浄することで補給した。培養及び基質除去実験時の温度は 20 度である。培養することにより活性汚泥の濃度は 200mg/l から 5000mg/lに増加した。基質除去実験に用いた有機物は 13 種のアミノ酸とグルコースで、有機物濃度はT O C計を用いて測定した。

2.2 実験結果

表-1 にペプトン及び5種のアミノ酸で各々培養した活性汚泥の有機物除去速度を培養有機物の除去速度に対する相対速度で示した。また表-1 には、培養アミノ酸ならびにアミノ酸混合物（ペプトンのアミノ酸含有率に調整した）の除去速度も示した。ペプトンならびに5種のアミノ酸で培養した活性汚泥の 14 種の有機物に対する基質除去特性にはほとんど差がない。概略では、どの活性汚泥においても Ala, Ser, Glu, Asp, グルコースの相対除去速度は 30 %以上を示し、His, Val, Ile, Leu, Lys, Phe の”必須アミノ酸”のそれは 30 %以下であった。その中で、Leu 培養活性汚泥の Ala・Ser・Glu・Arg および Lys 培養活性汚泥の Ala・Glu・Asp の除去速度は培養有機物のそれより速くなっていた。また非必須アミノ酸の Ala Glu で培養した活性汚泥が必須アミノ酸を除去する相対速度は 10 %以下である。培養アミノ酸の種類により Gly, Arg, Thr の除去速度は大きく異なっていた。ペプトン培養活性汚泥による Arg の除去速度が必須アミノ酸であるのに非必須アミノ酸の除去速度とほぼ同じであった。Leu 培養活性汚泥による Arg の除去速度が高いことがその原因となっているのであろう。

単独の必須アミノ酸で培養した活性汚泥が他の必須アミノ酸を除去する相対除去速度は 30 ないし 10 % 以下であるから、活性汚泥にとって必須アミノ酸は取り込みにくいとの結論は簡単にできる。

しかし見方を変えれば、単独のアミノ酸で培養された全ての活性汚泥が基質としてまったく投与されたことのない数多くのアミノ酸やグルコース（培養アミノ酸より速い場合もある）をかなりの早さで取り込んでいるのである。馴致されていない有機物が細菌により取り込まれているのは信じがたい。混合培養系であるので、何らかの形（共生や食物連鎖など）で基質となる有機物が供給されているのであろう。

培養された活性汚泥は必須アミノ酸の中間代謝物として非必須アミノ酸やグルコースを取り込んでいることも考えられる。そこで Phe 培養活性汚泥を用いて、Phe と他の有機物間との基質選択性指標を測定した。その結果を表-2に示す。Phe と他の有機物間との基質選択性指標はすべて 80 %以上を示しており、Pheと他の有機物を取り込む微生物は別種の細菌であることが推定される。Phe 以外の他の有機物間の基質選択性指標を 80 %と仮定すると、Phe 培養活性汚泥の Ala, Glu, Asp, の合計除去速度は $38 \times 0.8^3 = 17$ (mg/g・Mlss・h) となり、培養有機物である Phe の除去速度とほぼ同じである。また表-1に示すように単独アミノ酸培養活性汚泥のアミノ酸混合物の除去速度は培養アミノ酸のそののほぼ2倍を示していた。これらのことから単独のアミノ酸で培養した活性汚泥はアミノ酸の除去に関して普段は持っている Potential の半分位しか使用してないことになる。個々の有機物を利用する細菌の活性度は不明であるが、易分解性有機物であるアミノ酸に対する活性度は同程度と仮定してよからう。そうすると Phe 培養活性汚泥において Phe を利用する細菌は全細菌中の 約 50 %を占めることになる。したがって、活性汚泥中には培養に用いられた有機物を利用している細菌の他、培養には用いていない他の有機物だけを利用している細菌群がほぼ同数存在していることになる。

硫酸や尿素を硝化している活性汚泥において、独立栄養細菌とほぼ同数の従属栄養細菌の存在が確認されている(5)。この報告は活性汚泥における微生物相について筆者の結論と同質のものである。

以上の結論は単独の有機物で培養された活性汚泥の細菌相である。複数の有機物で培養された活性汚泥の細菌相が単独の有機物で培養された活性汚泥の細菌相より単純になるとは考えられない。活性汚泥中には流入有機物の浄化には直接は関与しない細菌が多数共生(棲)しており、これらの細菌が活性汚泥のフロック形成など系の安定化に大きく関与しているものと考えられる(単一菌株では活性汚泥のような強固なフロックは形成されない)。

本研究を行なうに当たり、微生物学の基本については本学理学部・生物学科・微生物生態学教室・滝井助教授に討議して頂いた深謝申し上げます。またTOC計の使用について便宜を計って頂いた落合助手をはじめとする本学理学部・化学科・分析化学教室の皆様にご礼申し上げます。

(1)高橋 甫 他訳:微生物学(上)、p 34, pp.275-305, 倍風館、1978
(2)須藤 隆一他訳:活性汚泥の細菌学、産業用水調査会、1973
(3)E.Stumm-Zollinger: Applied Microbiology, vol.14, no.4, pp654-664, 1966
(4)生方 悠:第 25 回衛生工学研究論文集、土木学会、1989
(5)三上 栄一:微生物の生態 2 (相互作用をめぐって)、pp.125-145, 東京大学出版会、1975.

Table-1. Relative removal rate of amino acids

	Activated sludge acclimated					
Substrate	Pep	Glu	Ala	Leu	Phe	Lys
Ala	○	○	—	◎	○	◎
Ser	○	○	○	◎	○	○
Glu	○	—	○	○	○	◎
Asp	○	○	○	○	○	◎
Gly	△	△	○	◎	△	○
Arg	○	○	○	◎	△	○
Thr	*	△	○	△	△	△
His	△	*	△	△	*	△
Val	*	*	*	△	*	△
Ile	*	△	*	△	△	△
Leu	△	*	*	—	△	△
Lys	*	*	*	*	*	—
Phe	*	*	*	△	—	*
Glucose	○	○	◎	◎	○	◎
Acclimated		33	15	16	22	11
A.A.mix	75	53	28	55	39	26
	* < 10 < △ < 30 < ○ < 100 < ◎ (%)					

* < 10 < △ < 30 < ○ < 100 < ◎ (%)

Table-2. Removal rate and SSI of Phe acclimated A.S.

	removal rate	SSI %
Phe	15.5	
Ala	8.3	83
Glu	14.4	92
Asp	15.6	82
Leu	2.1	80
Lys	0.7	100
Glucose	8.2	92

(g/g.ss.h)