

嫌気性微生物から抽出した細胞外ポリマーの凝集能

長岡技術科学大学大学院 ○ 橘 敏明
ア ジ ア 工 科 大 学 原田 秀樹
長岡技術科学大学工学部 桃井 清至
長岡技術科学大学工学部 滝沢 智

1 はじめに

廃水の嫌気的処理法の一つに、生物膜付着担体を用いず微生物自身により沈降性の高いグラニュール状塊を形成させ、高濃度の生物量を反応器内に保持することのできる上昇流嫌気性スラッジブランケット (Upflow Anaerobic Sludge Blanket; UASB) 法がある。この処理方法で最も重要なものは微生物自身の凝集、集塊化であり、これはUASB法のみならず二相消化法の酸生成プロセスや脱窒素プロセスでも見られる。このような微生物の凝集には一般に多糖、蛋白、核酸や脂質、またそれらを含む複合体である微生物の細胞外ポリマー物質が大きな役割を果たしていると考えられている¹⁾。しかしこれらのポリマーがどのような役割をもち、どのような機構で細胞が付着、集塊化するかはあまり知られていない。そこで本研究は、嫌気性微生物群の自己凝集に関与すると考えられる細胞外ポリマーを抽出し、その凝集能について行った実験結果を報告する。

2 材料及び実験方法

2. 1 グラニュール汚泥の破壊、細胞外ポリマーの抽出

細胞外ポリマー抽出のためのグラニュール汚泥は、糖系基質UASBリアクター (全容積374 l、流入COD_{cr}=5000mg/l、負荷10kgCOD_{cr}/m³day、COD_{cr}除去率85%以上) より分取し、10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で3回基質洗浄したものを用いた。次に、10mMトリスマレイドNaOH緩衝液(pH7.0)250mlを共栓つき三角フラスコにとり、EDTAを最終濃度で1mM、5mMにし、沈降した上記グラニュールを20ml加える。ロータリーシェイカーで振とう (35°C、138rpm) し数時間間隔でサンプルを混合しながら20ml試験管に採取する。ブランク (BL) 実験としてEDTA溶液の代わりに純水及び緩衝液で上記と同様の操作を行う。その後正確に10分静置させ、その上澄み4mlの濁度をOD₆₆₀で測定する。さらに上澄みをろ過し、全糖濃度 (フェノール硫酸法)、蛋白濃度 (ブロテインアッセイ法) を測定する。

上記の処理後、48時間振とうした5mMEDTA振とう溶液を静置及び遠心分離 (15000rpm, 10min, 4°C) により、上澄み及びEDTA遊離菌体を回収する。上澄みをろ過後、蒸留水で透析し、これをEDTA振とう抽出液とする。

2. 2 凝集能実験

細胞外ポリマーの凝集能実験は、EDTA振とう抽出液に回収遊離菌体またはカオリンなどの凝集基質 (凝集対象物) とCa²⁺ (最終濃度5mM) を加え純水で10mlとする。そして穏やかに数分間傾斜混合した後静置し、その凝集能を上澄み4mlの濁度 (OD₆₆₀) と、ブランク (BL) との差より評価する。また以下のように条件を変えた場合 (表1) の凝集能を同様の操作で行う。

①凝集基質及び濃度 ②カチオンの種類及び濃度 ③抽出方法、抽出液濃度 ④pH ⑤熱処理

ここで抽出方法は、基質洗浄後のグラニュールをホモジナイズした後、以下のように行う。20%フェノール抽出は、20%フェノール液と等量の汚泥をウォーターバス70°Cで20分間抽出し、水冷する。そして遠心分離 (10000rpm, 30min, 4°C) により上澄みを回収、ろ過後ろ液を透析する。水蒸気抽出は、オートクレーブ (104°C、1.05kg/cm²、30分) の後、遠心分離 (15000rpm, 50min, 15°C) し上澄みをろ過する。0.1NNaOH抽出は、0.1NNaOH溶液に汚泥を加え、ロータリーシェイカー (138rpm、40分、20°C) で振とう後、遠心分離 (15000rpm, 10min, 4°C) で上澄みを回収、HClで中和そしてろ過する。EDTA抽出はホモジナイズした後5mMEDTA溶液に加えロータリーシェイカー (138rpm、3時間、20°C) で振とう後、遠心分離 (15000rpm, 20min, 4°C)、透析後ろ過し、ろ液を抽出液をする。またpHによる凝集能は、NaOH及びHClでpHを調整した純水を加えて全量10mlとする。ポリマーの熱処理は、EDTA振とう、EDTA抽出、NaOH抽出液を沸騰水浴上で1時間煮沸する。

表1 凝集能実験における条件

①凝集基質	種類	EDTA遊離菌体、活性汚泥、カオリン
	濃度	カオリン濃度を変化させる
②カチオン	種類	AlCl ₃ 、CaCl ₂ 、BaCl ₂ 、MgSO ₄ 、KCl
	濃度	CaCl ₂ 濃度を変化させる
③抽出ポリマー	種類	EDTA、NaOH、水フェノール、水蒸気抽出
	濃度	各抽出方法での抽出液
④ pH		NaOH及びHClで調整した純水を加えて全量を10mlにする。
⑤ 熱処理		EDTA振とう、EDTA抽出及びNaOH抽出液を沸騰水浴中で1時間加熱する。

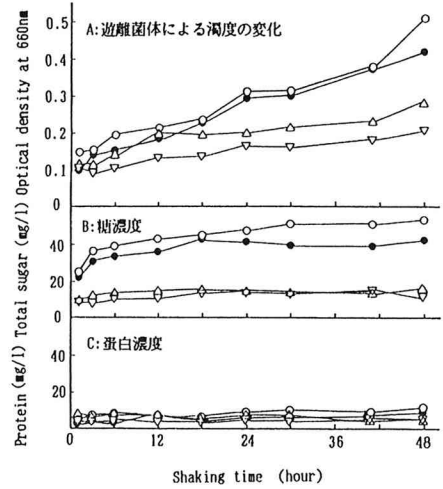
2. 3 細胞外ポリマーの分子量の推定

EDTA振とう抽出液をエバポレータ(35°C)で濃縮し、Sephacrose CL-2Bで分子分画する。分画後各フラクションの抽出液で凝集能実験を行う。

3 実験結果及び考察

EDTA溶液中でグラニュールを振とうしその経時的な濁度の上昇、及び各時点での糖、蛋白濃度を図1に示す。時間の経過に従い濁度が上昇し、糖が溶出したが、蛋白は糖に比べあまり溶出していない。これは、EDTAにより2価カチオンがキレートされ、菌体が分散化する過程で、菌体の凝集に参与していた糖が溶出している可能性を示唆している。次にこの溶液を透析した後、それにもう一度EDTAにより遊離した菌体を加え、再凝集させた結果及びカオリンを遊離菌体の代わりに用いたものを表2に示す。カオリン懸濁液にEDTA抽出溶液、 Ca^{2+} を入れた場合、濁度(OD₆₆₀)が減少し凝集能を発現した(写真1)。同様の現象は2価カチオン存在下、*Rhodococcus erythropolis*が生産する微生物凝集剤の各種懸濁液の凝集として報告されている²⁾。以上より凝集能発現には抽出溶液、 Ca^{2+} が関係し、その他にも凝集基質(凝集対象物)

が大きく影響することが予想された。そこで凝集基質、カチオンの種類と濃度を変化させた場合の凝集能を表3、表4及び図2に示す。凝集基質は、カオリンの他、活性汚泥、EDTA遊離菌体で、またカチオンの種類については、多価カチオンでは大差なく1mM濃度以上で、またカオリン濃度は実験したすべての濃度すなわち300~1500ppmで凝集能が発現した。振とうや静置時間を変化させた場合、それぞれ3分以上でOD₆₆₀が0.388から0.020に、また10分以上で0.360から0.071に減少し、これらよりポリマーと凝集基質の接触によるフロック化またその沈降に要する時間が必要であることがわか



○: 5mM EDTA ●: 1mM EDTA △: 純水
▽: トリス-マリン NaOH緩衝液(pH7.0)

図1 グラニュール汚泥振とう破壊実験

表2 EDTA振とう抽出液の凝集能

凝集基質	凝集能 ^{*)}	OD660
EDTA遊離菌体	++	----- ^{**)}
カオリン	++	0.080

BL カオリン 0.709
カオリン+ Ca^{2+} 0.528

*) ++ 凝集能を発現している
- 凝集能を発現していない

**) 測定せず

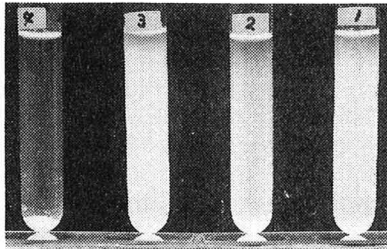


写真1 EDTA振とう抽出液の凝集能

1: カオリン 2: カオリン+ Ca^{2+}
3: カオリン+抽出液
4: カオリン+ Ca^{2+} +抽出液

表3 各種凝集基質と凝集能

凝集基質	濁度(OD660)			
	ポリマーなし 0分後	15分後	ポリマーあり 15分後	凝集能
活性汚泥	0.353	0.314	++	0.060
EDTA浮遊菌体	0.358	0.303	+	0.164
パン酵母	0.918	0.836	-	0.848
活性炭	0.185	0.162	-	0.170
セルロース	0.358	0.228	-	0.195

全て Ca^{2+} を5mM添加

表4 各種多価カチオンと凝集能

多価カチオン	濃度mM	凝集能	OD660(15分後)
AlCl ₃	5	++	0.027
CaCl ₂	5	++	0.027
BaCl ₂	5	++	0.030
MgSO ₄	5	++	0.038
KCl	5	+	0.140

BL カオリン+ Ca^{2+} 0.353
カオリン+ポリマー 0.312

全てカオリンにポリマーを添加

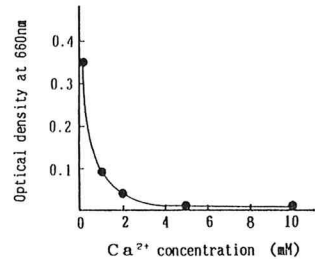


図2 Ca^{2+} 濃度と凝集能

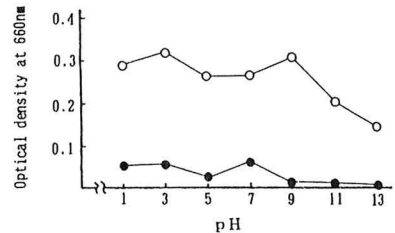


図3 pHと凝集能

る。抽出方法とポリマー濃度を変化させた場合の凝集能実験は、EDTA振とう抽出液で凝集能を発現した濃度にポリマー濃度を希釈して行い、その結果を表5に示す。0.1NNaOH抽出及びEDTA抽出液（ホモジナイズ後EDTAにより抽出したもの）でも凝集能がみられた。しかしこの両者は、より高いポリマー濃度、すなわち約20mg/l以上では凝集能は発現せず、凝集能発現

表5 各抽出ポリマーの凝集能

抽出方法	抽出濃度 ^{*)} (mg/l)	最終ポリマー濃度 ^{*)} (mg/l)			凝集能 ^{**)} OD660		
		14.8	7.4	3.7	++	++	++
EDTA振とう	37	14.8	7.4	3.7	++	++	++
	11	4.4	2.2	1.1	0.039	0.049	0.090
0.1NNaOH	140	14.0	5.6	2.8	—	++	++
	192	19.2	7.7	3.8	0.325	0.076	0.063
EDTA抽出	112	22.4	11.2	4.5	—	+	++
	39	7.8	3.9	1.6	0.302	0.147	0.045
20%水フェノール	395	15.8	7.9	4.0	—	—	—
	21	0.8	0.4	0.2	0.327	0.293	0.264
水蒸気抽出	612	24.5	12.2	6.1	—	—	—
	397	15.9	7.9	4.0	0.382	0.362	0.319

*) 上段：糖濃度

下段：蛋白濃度

**) 上段：凝集能

下段：OD660 (15分後)

カオリン + Ca 0.353 (15分後)

には最適な濃度が存在し、それは糖、蛋白濃度で約10mg/l程度以下であった。また凝集能が発現するだろうと考えられるポリマー濃縮においても、抽出方法によりその発現に違いが生じた。これは、凝集能を有さない水フェノール、水蒸気抽出ではいずれも抽出過程で熱による処理が加えられている、すなわち抽出力が強すぎて多様な抽出物質が抽出されたか、熱による何らかの作用を受けたためと考えられる。次に多価カチオンが関与することよりポリマーの電荷が関係すると思われpHを変化させた結果を図4に、また熱処理した結果を表6に示す。Ca²⁺の存在下では凝集能は変化せず、また熱処理を行っても同様に凝集能は消失しなかった。そこでこのポリマーの分子量を推定するためにSephacrose CL-2Bで分子分画した結果を図5に示す。抽出したポリマーは二つのピークに分画され、ボイド容量で溶出したピーク1でのみ凝集能が発現している。すなわち凝集能を有するポリマーは、分子量で考えるなら、多糖類では20×10⁶、蛋白質では40×10⁶以上である。

4 おわりに

本研究で得られた知見を以下に整理する。

- ① EDTA溶液でグラニューロを振とうすることにより、菌体が遊離し糖が溶出した。
- ② EDTA振とう抽出液は多価カチオンの存在下、EDTA遊離菌体、カオリン活性汚泥を凝集沈降させる能力を有する。
- ③ 凝集能は抽出方法により凝集能は異なり、EDTA、NaOH抽出液は凝集能を発現し、水フェノール、水蒸気抽出液は発現しなかった。また凝集能発現に最適な濃度が存在する。
- ④ Sephacrose CL-2Bで分子分画した結果、糖で20×10⁶、蛋白で40×10⁶以上の分子量を持つポリマーが凝集能を発現した。

参考文献

1. Hariris, R.H. and R. Mitchell : The Role of Polymers in Microbial Aggregation, Annual Review of Microbiology 27, 27~50 (1973)
2. 倉根隆一郎：バイオポリマーによる排水の高度処理、用水と廃水, 30 (10), 20~26 (1988)

表6 熱処理ポリマーの凝集能

抽出方法	非熱処理		熱処理 ^{*)}	
	凝集能	OD660	凝集能	OD660
EDTA振とう	++	0.033	++	0.028
EDTA抽出	++	0.033	++	0.031
0.1NNaOH	++	0.051	++	0.055

*) 熱処理条件：沸騰水浴上で1時間煮沸

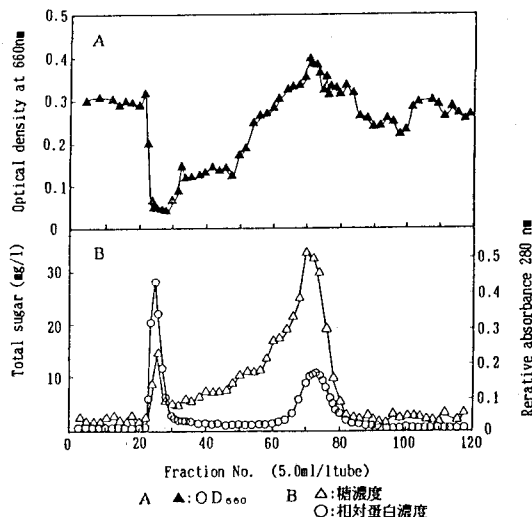


図4 EDTA振とう抽出液のSephacrose CL-2Bによる分子分画