

九州大学 ○久場隆広

茨城大学 古米弘明

九州大学 楠田哲也

1.はじめに

生物学的廃水処理に関わる微生物フロックや生物膜、自己凝集汚泥の形成において細胞外バイオポリマーは重要な物質の一つである。このバイオポリマー量を決定するためには、まず微生物細胞から細胞質を漏出させたり、細胞壁を破壊することなしに細胞外バイオポリマーのみを剥離抽出しなければならない。その抽出法として、従来様々な方法が提案、検討されてきた^{1)~4)}。これらの抽出方法は、付着凝集現象を生物学的に解明するために提案されたものであり、いくつかの複雑な抽出段階を必要とし、また長時間を要する場合が多い。

本研究では、嫌気性完全混合槽で培養された汚泥を供試汚泥とし、いくつかの細胞外バイオポリマーの簡便な抽出方法(アルカリ抽出・熱水抽出・冷却抽出・水蒸気抽出)について比較検討を行う。細胞外バイオポリマー量の指標として、各抽出液中の糖およびタンパク質濃度を比較し、また、細胞外バイオポリマー抽出後の微生物細胞の相対的な分散状態や相対的な細胞数を、顕微鏡観察により検討する。

2.実験方法

2.1供試培養汚泥

下水処理場の嫌気性中温消化槽汚泥を植種し、嫌気性完全混合槽(5l)内で約50日間培養した汚泥を実験に用いた(MLSS濃度は3200mg/l、MLVSS濃度は1800mg/l)。グルコースを唯一の有機源とした基質⁵⁾を用い、1日1回基質を与えるFill&Draw方式により汚泥を培養した。培養温度は35℃、水理学的(汚泥)滞留時間は約10日、容積負荷は約1kg-COD/l/dayである。

2.2細胞外バイオポリマーの簡易抽出方法

アルカリ抽出および熱水抽出、冷却抽出、水蒸気抽出による各抽出液中の糖およびタンパク質濃度について比較検討を行った。また、抽出操作後の微生物細胞の相対的な分散状態と相対的な細胞数を顕微鏡観察により比較した。これらの検討から、各操作により細胞外バイオポリマーが抽出されることによって細胞の分散性が向上しているか、または細胞が破壊され、細胞数が減少していないかを検証した。

反応器から採取した懸濁液5mlを遠心分離(2100×g、10分間)し、上澄を捨て、汚泥を生理食塩水5mlに懸濁させた。この汚泥を用い、各抽出操作を以下のように行った後、超遠心分離(10000×g、30分間)した上澄を抽出液とした。

- (1)アルカリ抽出法³⁾:約1%W/Vになるように37%ホルムアルデヒド溶液0.15mlを添加し、攪拌後室温で約15分間静置する。1N NaOHを2ml添加し、所定の時間(1分あるいは3分、5分間)氷冷下で超音波分散装置(25W)にかけ、細胞を分散させた後、1N HClで中和する。
- (2)熱水抽出法³⁾:約0.2%W/Vになるように37%ホルムアルデヒド溶液0.03mlを添加し、沸騰水中で15分間攪拌する。
- (3)冷却抽出法³⁾:約0.2%W/Vになるように37%ホルムアルデヒド溶液0.03mlを添加し、攪拌後所定の時間(1分あるいは3分、5分間)氷冷下で超音波分散装置(25W)にかけ、細胞を分散させる。
- (4)水蒸気抽出法⁴⁾:オートクレーブ110℃中で60分間の抽出を行う。

3.実験結果および考察

3.1タンパク質変性剤の比色定量への影響

(1)糖濃度測定 標準液としてグルコースを用い、抽出液中の糖濃度をAnthrone法により定量した。抽出操作において添加するホルムアルデヒドは、糖濃度分析上の阻害物質である。そのため、各抽出液2mlを試験管にとり、一旦全ての水分を気化させることにより、ホルムアルデヒドを除去した後、蒸留水2mlを加えて分析を行うことを試みた。

標準液(グルコース、0~50mg/l)を用いて、上記の操作による定量的な影響を調べたところ、操作の有無によらず両者の分析結果は一致した。したがって、この操作により糖濃度分析に影響を与えることなく、ホルムアルデヒド溶液の阻害を除去する事が可能であると考えた。

(2)タンパク質濃度測定 標準液として牛血清アルブミン

を用い、タンパク質濃度をLowry法により定量した。糖濃度分析と同様に、ホルムアルデヒドはタンパク質濃度分析上の阻害物質である。図-1に、標準液(牛血清アルブミン)にホルムアルデヒドを添加した場合と無添加の場合の標準液濃度(0~150mg/l)と吸光度(750nm)の関係を示した。ホルムアルデヒドを添加した場合、約20%の発色阻害が起こった。

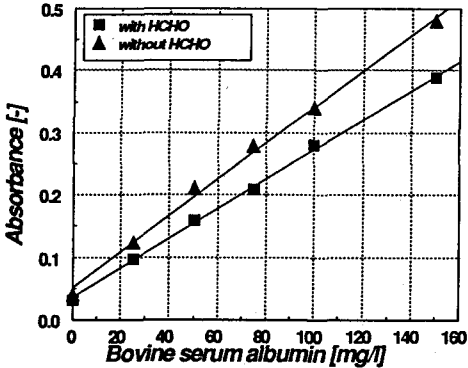


図-1 ホルムアルデヒド(HCHO)を添加した場合と無添加の場合の標準液濃度と吸光度の関係

次に、完全混合槽内の汚泥の加水分解液をサンプルとして用い、ホルムアルデヒドの添加の影響について調べた。図-1に示したそれぞれの検量線を用いて、タンパク質濃度を求めたところ、両者の濃度に差がない事が確認された。したがって、ホルムアルデヒドを添加した標準液を用いて抽出液中のタンパク質濃度を測定できるものと考えた。

3.2微生物細胞の相対的な分散状態および細胞数の比較

表-1に微生物細胞の相対的な分散状態および細胞数の比較を示す。顕微鏡観察から、冷却抽出では、微生物細胞の分散が相対的に良い事が確認された。これは細胞外バイオポリマーが剥離し、その結果、微生物細胞が一樣に分散したのと考えられる。アルカリ抽出や熱水抽出では分散が悪く、抽出前の汚泥より相対的な細胞数も少なかった。また、水蒸気抽出では相対的な細胞数が非常に少なく、抽出操作により細胞が破壊され、細胞質が漏出している可能性のあることが示唆された。

3.3各抽出液中の糖・タンパク質濃度の比較

図-2(a)、(b)に各抽出液中の糖およびタンパク質濃度の比較を示す。熱水抽出およびアルカリ抽出、水蒸気抽出では汚泥の分散状態が悪いにもかかわらず、糖とタンパク質濃度が高いことや、細胞数の減少が見られた水蒸気抽出で値が最も高いことから、これらの方法では細胞内部の糖・タンパク質も抽出されている可能性のあることが示唆された(表-1)。以上のことから、これら4つの細胞外バイオポリマーの簡易抽出法のうち、冷却抽出法が、細胞質を漏出させることなく細胞外ポリマーを抽出可能な最も良い方法であると思われる。

表-1 抽出操作後の細胞の相対的な分散状態および細胞数

抽出方法	相対的分散状態*	相対的細胞数	ECP-糖濃度 [mg/l]	ECP-タンパク質濃度 [mg/l]
(1)アルカリ	++	++	70	150
(2)熱水	+	++	80	145
(3)冷却	+++	+++	20	130
(4)水蒸気	++	+	90	225

*: +が多いほど、相対的な分散性が良いことを示す。

3.4冷却抽出法に関する検討

冷却抽出において超音波分散時間を長くするに従い、抽出液中の糖・タンパク質濃度はほぼ一定の値に近づく傾向にあった。そのため、超音波分散時間を0.5～10分で変化させ、冷却抽出による抽出液中の糖・タンパク質濃度の測定を行った結果、4～6分ではほぼ一定の値が得られることが明らかとなった。

次に、汚泥を数段階に希釈し、それぞれのサンプルに対して冷却抽出を行った(分散時間は4分)。図-3に菌体濃度と冷却抽出液中の糖・タンパク質濃度の関係を示す。いずれも両者は直線関係にあり、菌体量(MLSS)当たりの細胞外バイオポリマー量は一定となった。したがって、MLSSで3000mg/l以下の菌体濃度範囲内では、ポリマーの抽出は十分に行われることが確認された。

4.おわりに

顕微鏡観察より、冷却抽出の場合に細胞の分散性の良い事が確認された。これは、ECPが抽出されることにより分散性が向上したためと考えられた。各抽出液中の糖とタンパク質濃度の比較から、熱水およびアルカリ、水蒸気抽出ではこれらの濃度が高いことや抽出後の細胞数の減少から判断して、細胞の破壊による細胞質の漏出の可能性が示唆された。したがって、微生物相互の付着に直接的に関わる細胞表面のバイオポリマーの抽出には冷却抽出法が適当であると考えられた。

[参考文献]

- 1)有馬啓、田村学造(1980) 生物による環境浄化、東京大学出版会、東京。
- 2)西川正三、栗山光央(1974) 活性汚泥中の粘質物成分としての核酸、醣工、52、335-338。
- 3)Sutherland, I. W. and Wilkinson J. F.(1971) Chemical extraction methods of microbial cells. "Methods in microbiology", vol. 5B, Chapter IV, Academic press, London and New York.
- 4)大橋晶良、原田秀樹、桃井清至(1989) 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、25、209-220。
- 5)久場隆広、古米弘明、楠田哲也(1990) PUF構造の有無による嫌気性廃水処理特性の違いについて、第27回下水道研究発表会講演集、13-15。

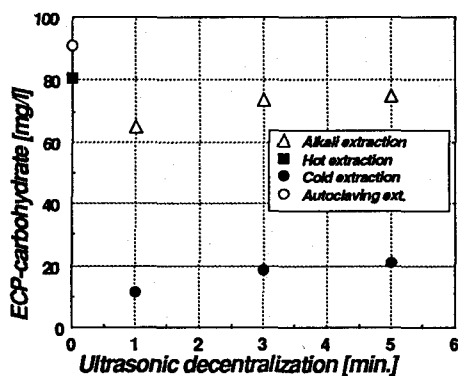


図-2(a) 各抽出液中の糖濃度の比較

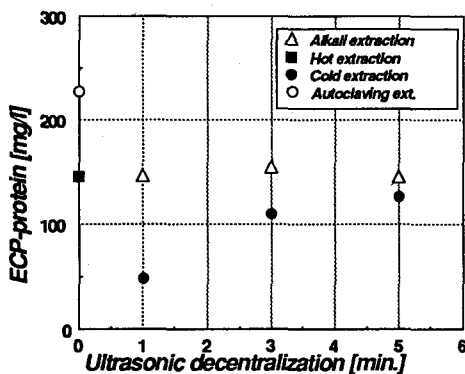


図-2(b) 各抽出液中のタンパク質濃度の比較

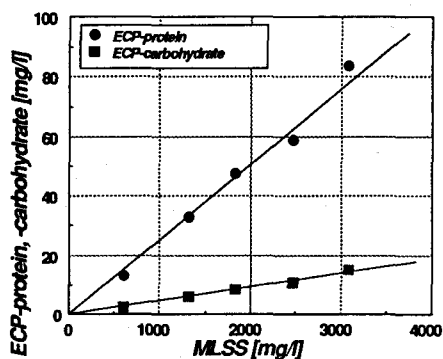


図-3 冷却抽出液中の糖およびタンパク質濃度と菌体濃度との関係