好気性微生物の自己凝集メカニズム

活性汚泥法に代表される浮遊式生物処理法、固定床法・流動床法に代表される生物膜法等ほとんどの生物学的水処理法は、その系内に微生物を保持するに際し、また、清澄な処理水を得るための固液分離工程において、微生物自体が持つフロック形成力、付着力を利用している。そして、このフロック形成、付着現象には微生物が産生する細胞外ポリマーが大きく関与していると考えられている。しかしながら、そのメカニズムについてはほとんど未解明であると言って過言ではない。

本特集においては微生物自身が持つ自己凝集メカニズムに焦点をあて、フロック形成のメカニズム、フロック形成に関与する物質の性質、活性汚泥から単離したフロック形成菌の特徴等、基礎的な側面からの種々のアプローチについて紹介する。(担当編集企画委員 オルガノ(株)・明賀春樹)

好気性微生物の凝集機構*

佐藤孝彦

1. 序 文

ここで「好気性微生物の凝集機構」という題をいただいたが、環境問題で、好気性微生物の凝集に関与しているのは活性汚泥である。もちろん活性汚泥形成菌

以外の好気性微生物で凝集を起こす多くの微生物があるであろうが、ここでは水質汚濁防止の観点より活性汚泥の凝集機構について総説的に論述する。

活性汚泥は下水および有機性の産業排水の生物処理法としてもっとも代表的な方法である。活性汚泥の特徴として2つの大きな性質がある。その1は好気性菌による有機物の分解が曝気によって効果的に行われること。その2として曝気を止めて静止すればフロックを形成して沈殿し、処理水と汚泥の分離が容易に行われることである。

この活性汚泥のフロック形成能力は活性汚泥の性質として非常に大切な性質である。しかし活性汚泥を扱っているとフロック形成をすることが当たり前であり、その性質がなくなるバルキングは異常現象というように考えられているが、大腸菌等を液体培地で培養した時では均一な懸濁菌培養液になることが多く、凝集を起こす細菌集団というものは一般の細菌としてむ

Takahiko Sato

昭和34年 九州大学理学部大学院修士
課程修了

35年 鹿児島大学医学部助手

45年 岐阜薬科大学助教授

平成元年 岐阜薬科大学教授

薬学博士 医学博士

〔趣味〕 CD(クラシック)旅行

* Mechanism of Flocculation by Aerobic Microorganisms,
1990年2月7日受理

しろ例外的なことである。活性汚泥は細菌の集団であり、細菌の集団としてはフロックを形成する方がより少ない現象である。この活性汚泥のフロック形成の本質については今まで多くの研究がなされているがまだ確定的なことはわかっていない。ここにフロック形成について現在までに考えられている学説について解説する。

2. フロック形成に関する学説

フロック形成についてはいろいろの諸説があるが、大きく分けると次のようになると思われる^{1),2),3)}。

- (1) Zoogloea 説
- (2) エネルギー含有説（動電力説）
- (3) PHB 説（重合説、スダン染色性顆粒説）
- (4) イオン結合説
- (5) 原性動物説
- (6) スライム説（ゼリー状細胞間物質説、細菌夾膜説）

一番初めの Zoogloea 説は活性汚泥の凝集原因に関する説として一番初めに提案されたものである。1935 年 Butterfield は活性汚泥よりフロック形成細菌として Zoogloea ramigera を分離した⁴⁾。この菌はゼリー状のスライムを生産しフロックを形成する細菌で、活性汚泥のフロックはこの細菌が主体となって形成されるものと考え、その後この説が広く世間に受け入れられてきた。しかし次のエネルギー含有説で述べるように 1952 年 Mckinney ら^{5),6)}は Zoogloea 以外の活性汚泥から分離された多くの細菌が単独でフロックを形成することを報告して、Zoogloea 説に疑問を投げかけ、その後多くの説が提案されてきた。最近では Zoogloea 説を発展させたスライム説が広く受け入れられるようになってきた。

2 番目のエネルギー含有説とは Mckinney の提案した説であり、Mckinney ら^{5),6)}は先にも述べたように、活性汚泥から分離した種々の細菌のうち、Zoogloea 以外にも、Bacillus, Escherichia, Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Paracolonobacterium, Nocardia 等に属する細菌が単独でフロックを形成することを報告し、細菌のエネルギー源が欠乏すると菌どうしの離れようとする力が弱まり結合すると考えた。しかしこの考えではほとんどすべての細菌で栄養不足の状態になればフロック形成がみられなければならないはずであるが、事実は必ずしもそうでなく、この説で活性汚泥のフロック形成を全面的に説明することは困難である。

次は重合説であるが、これは Crabtree ら^{7),8)}が提案した説でフロック形成は細胞内に貯蔵性脂質 poly- β -

hydroxybutyric acid (PHB) が蓄積することにより起こるという説である。PHB はスダンブラックにより染色され細胞内で顆粒状を示す。Crabtree らは PHB が細菌の体内に蓄積されると、細胞分裂が不完全になり、鎖状または不規則状につらなった形となりもつれ合い、さらに細胞呼吸が行われ細胞内の PHB 蓄積が増加すると、近接細胞間の PHB 分子間のエステル結合により、より堅い結合を生じ、これが凝集核になってフロックを形成すると述べている。しかし、凝集細胞と非凝集細胞の間に PHB の含量に差がないことが多くの研究者より提出され PHB 説に対し疑問が提出され^{1),9),10)}、現在はこの考えを信じている人はほとんどない。著者ら¹¹⁾もすでに 1974 年に PHB 含量が 0.07~0.1% というきわめて低い活性汚泥もバルキング現象を示しておらず、フロック形成には PHB 以外の因子が関与することが推定されることを報告している。

つぎのイオン結合説とは Tezuka¹²⁾の提出した説である。彼は下水処理場の活性汚泥の優占細菌である Flavobacterium sp. のフロック形成を調べた結果、本細菌は培地中に Ca と Mg が存在するとフロックを形成し、欠乏するとフロックを形成しない。また Ca と Mg の存在下で形成されたフロックを脱イオン水に懸濁させて軽く振盪すると、フロックはほとんど完全に崩壊する。このようにして得られた分散した細菌の懸濁液に Ca または Mg イオンを添加すると再びフロックが形成され、このフロックの形成と崩壊は細菌を殺したり、トリプシン処理をしても起こることを報告し、これらの結果より細菌の表面は負に帯電していることから、Ca や Mg が介在したイオン結合によってフロックが形成されると考えた。しかし Angelbeck and Kirsch¹⁰⁾は Zoogloea ramigera のスライムを形成しない菌株で Ca イオンと Mg イオンは凝集の成長を妨げ、キレートをくわえ陽イオンの濃度を低下させると凝集が促進されると報告した。さらに Unz and Farrah は Zoogloea¹³⁾での実験の結果、Ca イオンがフロック形成に影響することは確かであるが、これは細胞の凝集の効果を増すのみで、正常では分散している細胞を凝集することはできないと述べている。

原性動物説とは原性動物を重視する考えである。細菌と原性動物が共存するとフロックの形成が速い等、原性動物がフロック形成に関与している可能性は考えられるが、凝集の主要因は細菌であろう。

最後のスライム説は Zoogloea 説の発展として提案されてきたものである。スライム説は、細菌が分泌するゼリー状のスライムのなかに細菌細胞が埋没することによりフロックが形成されるというものである。

Zoogloea 説で述べたように Zoogloea もゼリー状のスライムを生産しフロックを形成する菌であるが、フロックを形成できる細菌は Zoogloea のみではない。近年活性汚泥および Zoogloea より種々の細菌性菌体外高分子が抽出され、その性質が調べられて、この説が非常に有力になっている。ところでこのような細菌性菌体外高分子物質はその抽出法が多種多用であるため得られた物質も糖類、蛋白質、DNA、RNA と多様である。特に糖類が多くその構成糖も報告されているが、これも多様であり、グルコースの報告が多く、ヘキソサミン、ウロン酸も報告されている¹⁴⁾。

3. 凝集物質

前述のように凝集原因物質として菌体外高分子が注目されてきて、どの物質が凝集原因物質であるかを追求した仕事が報告されてきているが、これも菌体外高分子物質と同様多種多様である。

まず著者らの仕事を紹介しよう^{15), 16), 17)}。著者らは活性汚泥から 2 または 0.1 規定の可性ソーダ溶液により粘質物を抽出し、この物質が pH 3 以下でカオリンおよび大腸菌懸濁液を凝集し、大腸菌より同じようにして得られた物質にはどのような pH 域でもそのような凝集を起こさせる能力がなく、この抽出物の分析を行い、それは蛋白質、RNA、DNA、糖類、灰分を含み、糖類としてはアラビノース、マンノース、ガラクトース、グルコース、アミノ糖を含むが、ウロン酸については疑わしく、また灰分中には Na, Fe, Ca, K を主とする多種類の元素を含むことを報告した。さらにこれらの物質を硫酸濃度を変えて塩析することおよび pH を変えることにより分画したところ、ある分画は凝集性を示し、他のある分画は凝集性を示さなかったが、その糖類、DNA、RNA、蛋白質の組成は凝集性を示す分画と示さない分画の間に本質的な差がなかった。さらに水酸化アンモニウムと EDTA による連続抽出および分画法により活性汚泥より 6 つの抽出物を得、この抽出物の性質を調べたところ、3 つの分画は酸性側で凝集能力を持つことが分かった。またこれらの各分画はすべて蛋白質、RNA、DNA、炭水化物、灰分を含んでいたが、各含量は各分画により異なっていた。しかしある特殊な物質の含量が凝集性に関与していることは認められなかった。

またこれら凝集能力をもつ分画を透析すると凝集能力が失われた。しかし、この透析により失われる低分子の凝集関与物質は金属イオンではなかった。さらにこれらの凝集を示す分画を Sephadex G-50 で分画し、その各分画の凝集能力を調べたところある分画は凝集性を示しある分画は凝集性を示さなかった。これより、

活性汚泥の凝集原因物質は一つに限られないと思われた。

つぎにこの特集に論文を寄せておられない方々の仕事の中から代表的と思われるいくつかの仕事をここに紹介する。

まず蛋白質に関するものとして、平石、銭谷¹⁸⁾は活性汚泥より抽出した粘質物は蛋白質を主体とし、アミノ糖を含む多糖および核酸からなる複合体であると報告し、Tenney ら^{19), 20)}はフロック形成に関与している菌体外細菌性高分子は多糖類、蛋白質、RNA、DNA より構成され、transport enzyme が凝集に本質的な物質であろうと述べている。高橋ら^{21)~26)}のグループは活性汚泥からフロックを形成するいろいろの細菌を分離し、その中のある菌はセルラーゼによりフロックの崩壊が起こるが、他の株のフロックは蛋白質加水分解酵素処理により崩壊することを認め、さらにこの凝集因子は分子量約 14 万の蛋白質性の物質であると報告している。また彼ら²⁷⁾は活性汚泥から分離された *Pseudomonas* sp. のフロックが deoxyribonuclease で脱フロックされることを報告しており、この仕事は核酸様物質のフロック関与を推定させる。

凝集原因物質を糖類に求める研究は多い。Wallen and Davis²⁸⁾は活性汚泥およびその分離菌より沸騰抽出により多糖類を得、また電顕により菌の周囲にある高分子物質が抽出されていることを観察し、これより多糖類が凝集の主要な要因と考えた。

セルローズが凝集原因になっていると思われる細菌の報告として Deinema and Zevenhuizen²⁹⁾、高橋ら^{21), 22)}、境と小崎³⁰⁾、Dugan ら^{31)~33)}の仕事等いくつかある。

また Unz and Farrah¹³⁾は Zoogloea の菌体外高分子にアミノ糖が存在し、これがフロック形成に関係があると述べ、DeWalle and Chian³⁴⁾はフミン物質を活性汚泥から抽出し、その中に含まれる炭水化物量が減るとフロック形成とその安定性が悪くなると言っている。

このように多糖類を凝集原因物質とする多くの実験結果があるが、多糖類が多ければ多いほどフロック形成が良くなるというものではない。そのような仕事として Forster³⁵⁾、滝口³⁶⁾、小田ら³⁷⁾、Beccari ら³⁸⁾の仕事がある。

また、小田ら³⁹⁾は活性汚泥のアルカリ抽出液には pH により分画が可能な数種のアルカリ抽出物質が存在し、それらは汚泥容量に影響を及ぼすと共に、カオリン等の懸濁粒子を凝集する性質を有しており、分画により凝集活性を示す pH 領域が異なる事を報告している。

4. ま と め

以上活性汚泥の凝集物質に関しては多くの物質が報告されており、その本質についてはまだ明らかにされていない。ここで活性汚泥の凝集物質を考えるにあたっていくつかの問題点を考えてみよう。まず一番目の大きな問題点は活性汚泥が凝集するのは活性汚泥が凝集する性質を持っていると考えるより、凝集するような細菌が集まったものが活性汚泥であるとも考えられる事である。活性汚泥をまったく初めから作るときのことを考えよう。この時排水を曝気しその上澄みを捨てるということを繰り返すことにより汚泥を作り上げる。この時薬品沈殿等を行い凝集を助けてやることも行われるようであるが、とにかくこの活性汚泥生成の原理は好気性菌のうち凝集する菌を集めるということである。細菌はそのままでは均一の懸濁液になることが多い。しかしある条件によっては凝集を起こす細菌も多く、その処理場の排水中に存在し、その条件で凝集する細菌が自然に濃縮された形で、活性汚泥は生成されていくのである。これより活性汚泥を形成する細菌はある特定の細菌と考えるより多くの細菌が関与しており、しかもこれらの細菌の混合物であり、流入する排水の組成および微生物の違いによりその微生物相は変わると考えられ、活性汚泥から種々の異なる凝集物質が得られるのは当然のことということになる。さらにこの考えを押し進めると活性汚泥を形成している微生物集団は各処理場で異なり、さらにその日その日の違い等によっても変動する可能性があり、その時の種々の条件により種々のフロック形成に関与している物質がある可能性がある。

次の問題としてはテクニク的なものであるが、前述のように活性汚泥の凝集に関係する微生物が多種類であるとする、現在行われているような活性汚泥からある種の細菌を分離しその凝集物質を調べるという方法ではその細菌がその活性汚泥の本質的な凝集原因菌であることが立証されておればよいが、そうでなければ本質的ではない凝集物質であるおそれがある。しかし活性汚泥のような場合その凝集に関与する本質的な微生物を決めるということはなかなか困難である。昔 Zoogloea の研究がなかなかすすまなかったのは Zoogloea の培養が困難であったことにもよる。そうすると優占種を決めるに当たってどのような培地でどのような条件下で菌を分離すべきかという問題がある。さらに優占種であってもその菌の作り出す粘質物の量が少ないまたは凝集能力が弱い場合もあるかも知れない。こう考えるとある特定の活性汚泥の凝集に関与している本質的な菌を定めるのさえ容易ではない。

しかし活性汚泥処理場のこれからの最大の課題は完全なオートメーション化である。そしてこのオートメーション化を行うにおいて最大の問題はバルキング問題である。このバルキング問題を完全に解決し、その対策を確立するためにはやはり活性汚泥のフロック形成が完全に解明されている必要があろう。活性汚泥のフロック形成の解明についてこれから、どのような方向にどのような手段で研究を進めて行けば良いか諸氏の御討論が待たれるところである。

なお最近、活性汚泥の研究からこのような細菌性のポリマーを凝集剤として使用する観点からの研究もなされており、このような仕事は活性汚泥の凝集原因を追求するという研究とは異なった意味で大いに意義ある仕事であろう⁴⁰⁾。

文 献

- 1) 木内幹, 相田浩 (1969) 活性汚泥とその微生物, 水処理技術, 10(6), 13-22.
- 2) 高橋俊三, 近藤邦夫, 加藤三千夫, 藤田利彦 (1969) 活性汚泥の生物学 (VIII), 水処理技術, 10(8), 5-14.
- 3) 手塚泰彦 (1971) 活性汚泥における細菌の役割, バイオテク, 2, 677-682.
- 4) C.T. Butterfield (1935) Studies of sewage purification. II. A. Zoogloea-forming bacterium isolated from activated sludge, *Public Health Reports*, 50, 671-684.
- 5) R.E. McKinney and M.P. Horwood (1952) Fundamental approach to the activated sludge process. I. Floc-producing bacteria, *Sewage and Ind. Wastes*, 24, 117-123.
- 6) R.E. McKinney and R.G. Weichlein (1953) Isolation of floc-producing bacteria from activated sludge, *Appl. Microbiol.*, 1, 259-261.
- 7) K. Crabtree, E. McCoy, W.C. Boyle and G.A. Rohlich (1965) Isolation, identification and metabolic role of the sudanophilic granules of *Zoogloea ramigera*, *Appl. Microbiol.*, 13, 218-226.
- 8) K. Crabtree, W. Boyle, E. McCoy and G.A. Rohlich (1968) A mechanism of floc formation by *Zoogloea ramigera*, *Journal WPCF*, 38, 1968-1980.
- 9) B.A. Friedman, P.R. Dugan, R.M. Pfister and C.C. Remsen (1968) Fine Structure and composition of the zoogloal matrix surrounding *Zoogloea ramigera*, *Jour. Bacteriol.*, 96, 2144-2153.
- 10) D.I. Angelbeck and E.J. Kirsch (1969) Influence of pH and metal cations on aggregative growth of non-slime-forming strains of *Zoogloea ramigera*, *Appl. Microbiol.*, 17, 435-440.
- 11) 佐藤孝彦, 小瀬洋喜 (1974) 活性汚泥の凝集原因物質に関する研究(第一報)活性汚泥での poly- β -hydroxybutyric Acid の生成, 衛生化学, 20, 310-316.
- 12) T. Tezuka (1969) Cation-dependent flocculation in a Flavobacterium species predominant in activated sludge, *Appl. Microbiol.*, 17, 222-226.
- 13) R.F. Unz and S.R. Farrah (1974) Bacterial Zoogloea formation, PB 235023 EPA 670/2-74-018, 1-86.

- 14) M.J. Brown and J.N. Lester (1979) Metal removal in activated sludge: The role of bacterial extracellular polymers, *Water Res.*, **13**, 817-837.
- 15) 佐藤孝彦, 小瀬洋喜 (1975) 活性汚泥の凝集原因物質に関する研究 (第2報) アルカリ抽出粘質物の凝集作用, 衛生化学, **21**, 55-59.
- 16) T. Sato and Y. Ose (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution, *Water Res.*, **14**, 333-338.
- 17) T. Sato and Y. Ose (1984) Floc-forming substances extracted from activated sludge with ammonium hydroxide and EDTA solutions, *Wat. Sci. Tech.*, **17**, 517-528.
- 18) 平石明, 銭谷武平 (1977) 水産廃水活性汚泥の微生物に関する研究 (第1報), 活性汚泥の酵素による分散と生菌数の測定, 日本水処理生物学会誌, **13**(2), 1-6.
- 19) J.L. Pavoni, M.W. Tenney and W.F. Echelberger, Jr (1972) Bacterial exocellular polymers and biological flocculation, *Jour. WPCF*, **44**, 414-431.
- 20) M.W. Tenney and F.H. Verhoff (1973) Chemical and auto-flocculation of microorganisms in biological wastewater treatment, *Biotechnol. Bioengi.*, **15**, 1045-1073.
- 21) 遠藤隆一, 高橋甫 (1980) 生物による環境浄化 (有馬啓, 田村学造編) p.3-17, 東京大学出版会.
- 22) A. Kato, K. Izaki and H. Takahashi (1971) Floc-forming bacteria isolated from activated sludge, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 439-456.
- 23) T. Endo, K. Izaki and H. Takahashi (1976) Pronase-susceptible floc forming bacteria: Relationship between flocculation and calcium ion, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2289-2295.
- 24) T. Endo and H. Takahashi (1980) Reconstitution of pronase-susceptible flocs of *Flavobacterium* sp., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2413-2418.
- 25) T. Endo and H. Takahashi (1981) Genetic evidence for the involvement of aggregation factor and other components in flocculation of *Flavobacterium* strain B, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 379-383.
- 26) T. Endo and H. Takahashi (1981) Partial purification and some properties of aggregation factor from pronase-susceptible floc forming *Flavobacterium* strain B, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 513-516.
- 27) K. Sukka, T. Endo, M. Watanabe, S. Okuda and H. Takahashi (1981) Deoxyribonuclease-susceptible floc forming *Pseudomonas* sp., *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 497-504.
- 28) L.L. Wallen and D.N. Davis (1972) Biopolymers of activated sludge, *Environ. Sci. Technol.*, **6**, 161-164.
- 29) M.H. Deineman and L.P.T.M. Zevenhuizen (1971) Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation, *Arch. Mikrobiol.*, **78**, 42-57.
- 30) 境博成, 小崎道雄 (1980) 都市下水活性汚泥から分離したフロック形成菌の諸性質, 日本水処理生物学会誌, **16**, 18-22.
- 31) B.A. Friedman and P.R. Dugan (1968) Identification of *Zoogloea* species and the relationship to zoogloeal matrix and floc formation, *J. Bact.*, **95**, 1903-1909.
- 32) B.A. Friedman, P.R. Dugan, R.M. Pfister and C.C. Remsen (1969) Structure of exocellular polymers and their relationship to bacterial flocculation, *J. Bact.*, **98**, 1328-1334.
- 33) A.B. Parsons and P.R. Dugan (1971) Production of extracellular polysaccharide matrix by *Zoogloea ramigera*, *Appl. Microbiol.*, **21**, 657-661.
- 34) F.B. DeWalle and E.S.K. Chian (1974) Kinetics of formation of humic substances in activated sludge systems and their effect on flocculation, *Biotechnol. Bioengi.*, **16**, 739-755.
- 35) C.F. Forster (1971) Activated sludge surfaces in relation to the sludge volume index, *Water Res.*, **5**, 861-870.
- 36) 瀧口洋 (1971) 活性汚泥中の粘質物に関する研究 (第3報) 粗粘質物粉末の採取, 用水と廃水, **13**, 606-611.
- 37) 小田宗宏, 日比野光一, 神辺道雄, 堀文安, 藤尾雄策 (1981) 凝集物質の産生条件と活性汚泥の膨化, 発酵工学会誌, **59**, 437-442.
- 38) M. Beccari, P. Mappelli, V. Tandoi (1980) Relationship between bulking and physiochemical-biological properties of activated sludge, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 969-979.
- 39) 小田宗宏, 神辺道雄, 土屋文安, 藤尾雄策 (1981) 活性汚泥容量の変化とその原因物質, 発酵工学会誌, **59**, 125-130.
- 40) 広瀬義夫 (1977) 微生物の作る凝集剤—幅広い凝集力に応用への期待—, 化学と生物, **15**, 29-30.