

〈研究発表〉

微生物の体外分泌物とトルエンガス除去特性との関係

高橋 知 広¹⁾, 樋 口 能 士²⁾¹⁾立命館大学大学院 理工学研究科 環境都市専攻
(〒 525-8577 草津市野路東 1-1-1 E-mail: rv0037hs@ed.ritsumei.ac.jp)²⁾立命館大学 理工学部 環境都市工学科
(〒 525-8577 草津市野路東 1-1-1 E-mail: higuchi@se.ritsumei.ac.jp)

概 要

主要な VOC 化合物で悪臭物質でもあるトルエンは、その微生物による代謝が広く知られているため、その除去への生物脱臭法の適用が数多く試みられているが、十分な処理速度が得られていない。本研究では、トルエン分解菌が分泌する EPS (細胞外高分子物質) に着目し、気相と微生物相の間に存在する液膜中の EPS 組成とトルエンガスの微生物による除去との関係について観察・把握するための基礎的実験を行った。その結果、EPS の糖、タンパク質の濃度がいずれもある範囲内にある状態に限り、除去速度が通常以上に向上するという可能性が示唆された。

キーワード：トルエン、生物脱臭法、トルエン分解菌、EPS (細胞外高分子物質)

原稿受付 2018.8.22

EICA: 23(2・3) 128-131

1. は じ め に

ガス状の大気汚染物質や悪臭物質を除去する生物処理装置の一つに充填塔型生物脱臭装置がある。この装置では、微生物増殖が進んだ充填層表面の生物膜上の液膜に代謝物が多く溶解しており、その成分で液膜性状が変化することにより、ガス除去特性に影響を及ぼすことが想定される。既報¹⁾では、トルエン分解菌である *Pseudomonas putida* およびトルエン分解菌を主体とする微生物群集を対象に、その増殖過程での体外分泌物の生成特性を観察した。さらに、この組成既知の体外分泌物を含む液体試料を、平面状の微生物膜上に液膜として存在させ、トルエンガスの除去特性を観察した。本研究では、既報の結果に基づいて、さらに広範な増殖条件で体外分泌物の生成特性を観察し、より多様な液膜組成で、微生物膜によるトルエンガス除去特性を観察した。

2. トルエンガスを基質とした微生物増殖時の体外分泌物挙動

2.1 実験方法

生物脱臭装置より循環栄養塩溶液を採取し、トルエン分解菌 *Pseudomonas putida* NB-K4 株 (以下、単離菌) を単離した。300 mL 容三角フラスコに液体無機栄養塩培地を 200 mL 入れ、単離菌のみ、あるいは単離菌と生物脱臭装置の循環栄養塩溶液との混合物 (以下、混合菌) を液体培地に接種した。液体培地と同時

に、容器内には小試験管を設置し、後述の条件で液体トルエンを注入し、容器内をトルエン飽和環境で維持するためにゴム栓で密封した。ただし、酸素不足状態を避けるために、フラスコ内気相はメンブランフィルターを介して外気と通じた状態とした。この容器 (Fig. 1) を 25℃ に設定したインキュベーターに静置し、約 1 週間の培養を行った。各培養条件で、培養が終了した培地を遠心分離 (14000 rpm, 10 min) し、その上澄み液について、Lowry 法でタンパク濃度を、フェノール硫酸法で糖濃度をそれぞれ測定した。

本研究では、単離菌と混合菌との間の比較とともに、液体トルエンの注入方法を様々に設定することで、体外分泌物が様々な組成、濃度で生成することを期待した。そこで注入方法には、[低暴露 A]: 培養開始時に 100 μ L の基質 (トルエン) を与え、それ以降基質を与えない飢餓状態を与える条件、[低暴露 B]: 培養開始時に 100 μ L の基質を与え、一時的な飢餓状態を与えてから新たに 100 μ L 注入する条件、[高暴露]:

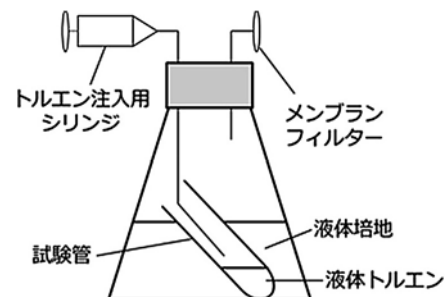


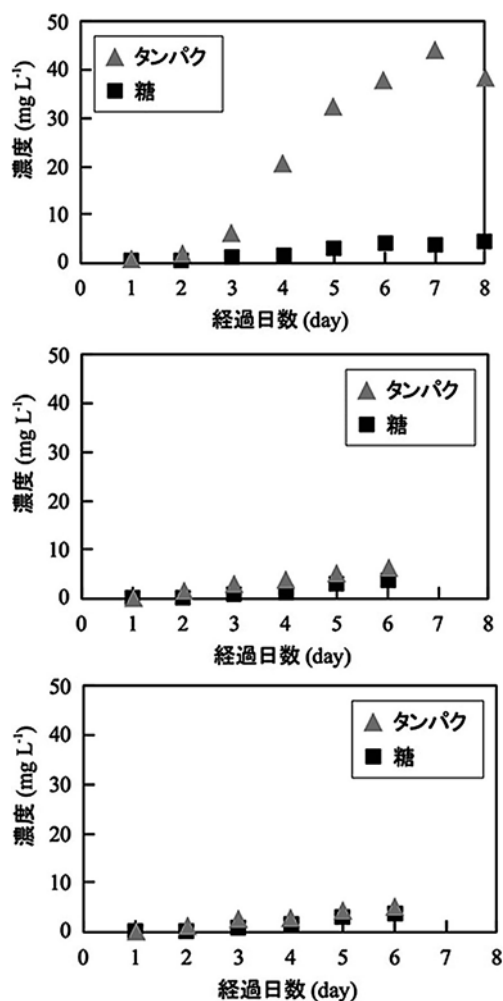
Fig. 1 Vessel for the liquid culture using gaseous toluene as the substrate

培養開始時に 700 μL の基質を与え、培養期間を通じて基質供給される条件、の3条件を設定した。

2.2 結果

養時に培地内で観察されたタンパクおよび糖濃度の経時変化を Fig. 2 に示す。相対的に [低暴露 A] におけるタンパクの著しい増加傾向が見られた。また、[低暴露 B] と [高暴露] では若干 [低暴露 B] の方で高い分泌物濃度が観察された。すなわち、基質が無くなる環境が維持されると、タンパクを多量に分泌する傾向が見られた。既報¹⁾でも類似の傾向が得られ、またタンパク濃度の過度な増加はトルエンガス除去を妨げる傾向にあった。したがって生物脱臭装置においては、トルエンガスの定常的な供給を維持することで、液膜中タンパク濃度の増加に起因するトルエンガス除去効率の低下が防止されることが想定される。

一方、微生物の増殖期間中に糖濃度の増減が確認された。体外分泌物中の糖は、微生物の増殖・生育に必要な栄養源としても利用されている可能性が示唆される。



(上：低暴露 A, 中：低暴露 B, 下：高暴露)

Fig. 2 Change of the concentrations of protein and sugar in the liquid media with the passage of time during the cultivation of the isolated strain

3. トルエンガス除去における液膜組成の影響

3.1 実験概要と実験方法

トルエンガス分解微生物が液膜へ分泌する代謝物に関して、これまで以下のような知見が得られている²⁾。

- i) 増殖の進んだ微生物群集の液膜には体外分泌物が溶解しており、その成分がトルエンガス除去能力の促進に寄与する場合がある。
- ii) 分泌物が高濃度になるとトルエンガス除去能力は低下する傾向にある。

これらの結果より、液膜中の体外分泌物が特定の濃度域にあるとガス除去が活発に行われる可能性があるとして仮定した。そこで、様々なトルエンガス暴露条件で上述の単離菌および混合菌を液体培養することで様々な濃度域 (タンパク・糖) の体外分泌物溶液を作製し、得られた溶液を平面上の微生物層 (生物膜) の上に液膜として配置してトルエンガス除去実験を行い、体外分泌物濃度とガス除去能力との関係を調査する。

実験ではまず、誘導期まで増殖が進んだと考えられる培養開始から 2 日後の単離菌培養液を採取し、湿潤基準で菌体密度が $0.5 \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mm}^{-2}$ となるよう、メンブランフィルター (25 mm ϕ , 孔径 0.45 μm) 上に生物膜を作製した。この生物膜付きのフィルターを 50 mL 容のテフロン容器底部に設置した後、先述と同様に、単離菌あるいは混合菌の様々な培養条件から採取し、別途タンパク濃度および糖濃度を測定した上澄み液を 500 μL 、生物膜上の液膜となるよう散布した。散布後は、液膜が 200 μL になるまで 40 $^{\circ}\text{C}$ のウォーターバスにて水分を蒸発させた後、セプタム付の蓋でテフロン容器 (Fig. 3) を密封し、容器内の初期濃度が 300 ppm となるよう、トルエンガスを注入した。注入後は 0, 1, 3, 5, 10 分経過後に、それぞれ FID 検出器付ガスクロマトグラフ装置にて容器内ガス濃度を測定し、トルエンガスの初期減少速度を以下の一次反応式に回帰してトルエンガス除去速度係数 k を算出した。

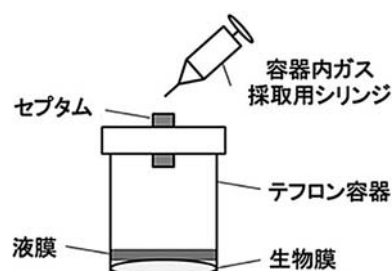


Fig. 3 Vessel for the gaseous toluene removal measurement

ガス除去速度算出式 $C/C_0 = \exp(-kt)$

C: 時間 t における VOC 濃度 (ppm)

C_0 : 初期 VOC 濃度 (ppm)

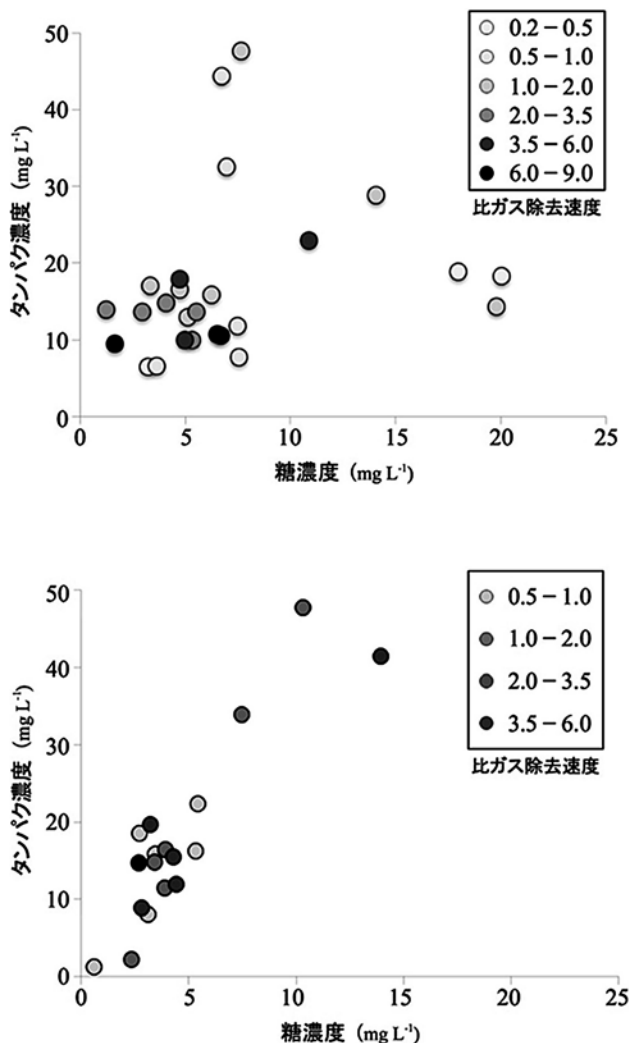
k: 除去速度係数 (min^{-1})

この試験では毎回、体外分泌物を含まない（すなわち培養前の）液体培地を液膜とした場合のトルエンガス除去速度係数も計測しており、このブランク値を基準とした各液膜条件での除去速度係数の比率を、「比ガス除去速度」として算出している。

3.2 結果

トルエンガスの比ガス除去速度と液膜中の体外分泌物（タンパク・糖）濃度との関係について、単離菌由来分泌物と混合菌由来分泌物の場合でそれぞれまとめた結果を Fig. 4 に示す。

単離菌由来分泌物に関しては、比ガス除去速度は約 0.2~8 と安定しない傾向を示した。ただし、糖・タンパク濃度とも一定の濃度範囲内にとどまる頻度が高く、



(上: 単離菌由来分泌物, 下: 混合菌由来分泌物)

Fig. 4 Relationship between the composition of secretion in the liquid layer and the toluene removal rate

その高頻度で出現する糖・タンパク濃度の範囲内で比較的高い比ガス除去速度が観察された。逆に、その濃度範囲を超えて高濃度域に達した上澄み液では、比ガス除去速度は低い傾向にあった。

一方、混合菌由来分泌物においては、比ガス除去速度は 0.5~6 と、単離菌由来分泌物と比較すると狭い範囲に集約されていた。また、糖濃度とタンパク濃度との比率が比較的一定値に近い状況であった。しかし、単離菌由来分泌物とは異なり、分泌物が高濃度の領域においても高い比ガス除去速度が観察されていた。高い糖濃度が観察されなかったことが、その一因として考えられる。

4. トルエンガス除去における生物膜の影響

4.1 実験概要と実験方法

上記の検討内容に加えて、生物膜の微生物群集の違いによるトルエンガス除去能力を比較した。誘導期まで増殖が進んだと考えられる培養開始から 2 日後の単離菌もしくは混合菌を様々な条件で培養した培養液を採取し、湿潤基準で菌体密度が $0.5 \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mm}^{-2}$ となるよう、メンブランフィルター (25 mmφ, 孔径 0.45 μm) 上に生物膜を作製した。ここで適用した培養条件として、微生物群集 (単離菌-混合菌)、トルエンガス暴露条件 (低暴露-高暴露) の他、液体培地中の無機栄養塩濃度 (前述実験と等倍濃度-前述実験の 10 倍希釈濃度) など、様々な条件で培養した微生物で生物膜を作製した。その後は先述と同様に 50 mL 容のテフロン容器底部に生物膜部を設置した後、単離菌の液体培地の液膜となるよう液膜を採取し、500 μL 生物膜上の液膜となるよう散布した。以降は先述と同様の手順で、トルエンガスの初期減少速度から得られたトルエンガス除去速度係数に基づいて、比ガス除去速度係数を算出した。

4.2 結果

各生物膜におけるトルエンガス除去速度係数を Fig. 5 に示す。単離菌と比較して混合菌の比ガス除去速度係数はわずかに大きい傾向を示し、10 倍希釈濃度で培養した生物膜の除去速度は低い傾向を示した。しかし、同一の微生物群集の中で培養条件等の違いによる比ガス除去速度の差異と比較して、液膜の違いによる比ガス除去速度の差異の方が顕著であった。実際に、等倍濃度の培地の液膜において測定結果の多くが比ガス除去速度係数 1 を下回り、希釈した培地の液膜において 1 を上回っていた。すなわち、少なくとも本実験条件の範囲内では、トルエンガス除去に対して生物膜よりも液膜による影響が支配的であった。

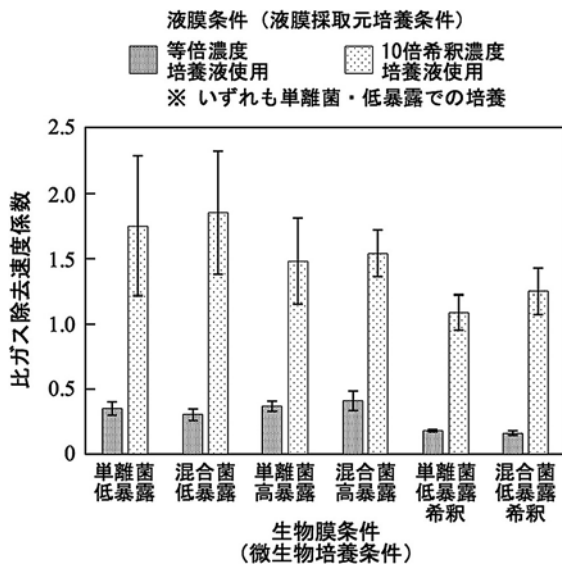


Fig. 5 Comparison of the toluene removal rate observed with microbe layers obtained under various kinds of cultivation conditions

5. 結 論

本研究では、単離菌由来の体外分泌物と比較して、混合菌由来の体外分泌物の方で総じて安定したトルエ

ンガス除去を得ていた。特に、単離菌由来の体外分泌物が高濃度域に達すると、ガス除去を阻害する傾向にあった。

基質であるトルエンガスを与えない期間を設けることで、液膜中タンパク濃度は極端に増加し、ガス除去を阻害する傾向が見られたため、ガスを常時供給して液膜が過剰なタンパク濃度となることを防止することが、トルエンガス除去を維持する上で有効と考えられた。混合菌では、基質の減少につれて糖濃度も減少することから、混合菌が分泌物中の糖成分を基質として利用している可能性が示唆された。トルエンガス除去に対する適切な液膜中分泌物濃度を把握するためには、増殖に伴う分泌挙動とガス除去との関係をさらに観察していく必要がある。

参 考 文 献

- 1) 辰見圭一 他, 第28回におい・かおり環境学会講演要旨集, pp.97-98 (2015)
- 2) 岸本大河, 「微生物由来の体外分泌物が生物脱臭装置における液膜性状とトルエンガス除去の与える影響」, 2014年度 立命館大学大学院理工学研究科修士論文, pp.22~31 (2015)