

## II-491

自己造粒汚泥からの *Beggiatoa alba* の純粋分離

大阪大学 正員 岩堀恵祐 正員 藤田正憲  
正員 古川憲治 武市 治

## 1. はじめに

最近、特殊微生物を活用した自己造粒活性汚泥法が開発され、その実用化が鋭意検討されている<sup>1), 2)</sup>。この汚泥自己造粒機構には、*Beggiatoa* 属の大型糸状菌が深く関与しており、これまで処理障害微生物と認識されてきた *Beggiatoa* が種々の観点から注目されてきた。しかし、活性汚泥中での生態学的役割、他の微生物との競合関係などの *Beggiatoa* に関する基礎的知見は十分に解明されているとは言い難い。そのためには、*Beggiatoa* を純粋分離し、その生理・分類学的特性並びに培養特性などを種々明らかにすることが重要であるが、種々の分離源を用い、しかも純粋分離の培地・操作法も明確に規定されていないのが現状である。ここでは、上記の点を鑑み、自己造粒活性汚泥から *Beggiatoa* 属細菌を純粋分離する方法を種々検討した。

## 2. 実験材料並びに方法

本研究では、平板に植え継ぎながら純化する方法（平板植え継ぎ法）と集積培養後に平板培養で純化する方法（集積培養法）を検討した。

## 2.1 平板植え継ぎ法による純粋分離

○ 分離源： 微好気自己造粒活性汚泥処理装置<sup>2)</sup>の壁面に付着した白い生物膜（マット）を用いた。

○ 供試培地： 表1の培地を高圧滅菌（120℃、20分）後、ペトリ皿に分注・固化して用いた。また、有機炭素源として、酢酸ナトリウム（0.1%、0.01%、0.001%）、乳酸ナトリウム（0.1%）、エタノール（0.1%、0.01%）をそれぞれ使用した。

○ 分離手順： 滅菌したイオン交換水（滅菌水）でマットを2回洗浄し、各種有機炭素源での *Beggiatoa* 並びに雑菌の増殖状態から、適正な有機炭素源とその添加濃度を決定した。次に、その有機炭素源を含有した分離用培地を用いて、各種濃度の  $\text{NaNO}_3$ （0.001～1.0%）、 $\text{NaCl}$ （0.1～0.4%）、 $\text{NaClO}$ （30%）及び消毒用エタノール（30%、70%）による薬剤処理実験を行った。ここでは、①マットの洗浄、②培地への添加、③寒天ブロックの洗浄を検討し、薬剤添加量並びにその処理条件を決定した。さらに、有効と認められた薬剤をガラス棒に塗布し、分離用培地に筋をいれて、滅菌水で洗浄したマットを、その筋の先端に植菌し、30℃で1日静置平板培養した。良好な増殖を示した *Beggiatoa* の先端を含有する寒天ブロックを無菌操作で切り出し、同一培地で再び培養した。この操作を繰り返して純化を行った。なお、純粋分離に成功したか否かは、光学顕微鏡（1000倍）による観察とL培地での雑菌の増殖有無で判断した。

## 2.2 集積培養法による純粋分離

○ 分離源： 先と同様のマットを用いた。

○ 供試培地： 表2の各種培地を高圧滅菌（120℃、20分）して用いた。なお、Soil extractは水道水1ℓに土壌500gを入れて2時間攪拌後のろ液（ろ紙5B）で、Extracted hayは大阪大学構内で採取した藁を30分間熱湯に浸漬後、水道水で2回すすぐ操作を5回繰り返したものである。また、活性汚泥抽出液は合成下水で培養した活性汚泥を高圧滅菌（120℃、20分）後、その遠心上澄液（3000rpm、10分）をろ過（ろ紙5B）したものである。

○ 分離手順： 洗浄マットを各種の供試培地50mℓに植菌し、30℃で静置集積培養後、先と同様の平板培養で *Beggiatoa* の純化とその確認を行った。

表1 分離用培地

| 成 分                                             | 成 分 量       |
|-------------------------------------------------|-------------|
| 有機炭素源                                           | 所 定 量       |
| $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 g       |
| カタラーゼ                                           | 40000 Units |
| 寒天                                              | 15 g        |
| ビタミン液                                           | 1 mℓ        |
| 無機塩1                                            | 100 mℓ      |
| 無機塩2                                            | 100 mℓ      |

注) HEPES BufferでpH7.0～7.2に調整  
イオン交換水で1ℓに調整

[ビタミン液]

| 成 分         | 成 分 量   |
|-------------|---------|
| パントテン酸カルシウム | 0.1 g   |
| ナイアシン       | 0.1 g   |
| ビオチン        | 0.005 g |
| シアノコハラム     | 0.005 g |
| 葉酸          | 0.1 g   |
| ピリドキシン      | 0.1 g   |
| p-アミノ安息香酸   | 0.1 g   |
| コハクキチン酸     | 0.1 g   |
| イノシトール      | 0.1 g   |
| 塩酸アミノ酸      | 0.1 g   |
| リボフラビン      | 0.1 g   |

[無機塩1]

| 成 分                                       | 成 分 量   |
|-------------------------------------------|---------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 0.5 g   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g   |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.05 g  |
| EDTA                                      | 0.003 g |

[無機塩2]

| 成 分                                       | 成 分 量   |
|-------------------------------------------|---------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 0.11 g  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                  | 0.085 g |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.002 g |

注) ビタミン液と無機塩はイオン  
交換水で100 mℓに調整した

### 3. 実験成績並びに考察

#### 3.1 平板植え継ぎ法による純粋分離

○ 有機炭素源の利用： 各種有機炭素源添加による *Beggiatoa* と雑菌の増殖状態を表5に示した。 *Beggiatoa* がよく増殖し、しかも本菌付着細菌の増殖が少ないという分離用培地の条件をいずれも満足していなかったが、酢酸ナトリウムを有機炭素源、その濃度を0.01%にした場合が最も有効であった。

○ 薬剤処理の効果：  $\text{NaN}_3$  によるマット洗浄の影響を表6に示した。本表より、0.5～1.0%の濃度では両者とも増殖しなかったが、それ以下の濃度では、両者とも同程度に増殖し、しかも低い濃度ほどよく増殖することがわかる。  $\text{NaN}_3$  及び  $\text{NaCl}$  を分離用培地に添加した場合、高い濃度では両菌とも増殖せず、また低い濃度では *Beggiatoa* より雑菌がよく増殖した。さらに、  $\text{NaClO}$

及びエタノールで寒天ブロックを洗浄した場合（前者；5分と10分、後者；1秒）、両菌とも全く増殖できなかった。したがって、0.1%の  $\text{NaN}_3$  でマットを洗浄する方法が最も効果的であることがわかった。

○ マットからの純粋分離： 上記の成績から、0.01%の酢酸ナトリウムを含む分離用培地に0.1%の  $\text{NaN}_3$  を塗布したガラス棒で筋を入れ、そこに0.1%の  $\text{NaN}_3$  で洗浄したマットを置いて5～6回繰り返し平板培養したところ、雑菌の認められないコロニーが顕微鏡で観察されたので、これをL培地で振盪培養したところ、雑菌の増殖がなかったため、純粋であると判断した。

#### 3.2 集積培養法による純粋分離

10日間培養後の顕微鏡観察から、 *Beggiatoa* の集積状態は次のように判断できた。②～⑥の各培地では *Beggiatoa* がよく集積していたが、雑菌（桿菌）も同様に増殖していた。しかし、培地①では、 *Beggiatoa* の集積度合は小さかったが、桿菌は全く認められなかった。この桿菌は平板培養で取り除くことが非常に困難な細菌であるので、培地①で集積したマットを2～3回繰り返し平板培養したところ、純粋分離できた。

以上の2種類の方法で純粋分離できた *Beggiatoa* 属細菌は、circulant-type colonyが観察され、糸状体幅が3.2～3.6  $\mu\text{m}$ であったので、Bergey's Manual 第8版から、 *Beggiatoa alba* と同定した。

〈参考文献〉 1) 高橋：衛生工学研究論文集、25、171 (1989) 2) 橋本 他：平成元年度日本醗酵工学会大会講演要旨集、127 (1989)

表2 集積培養培地

| 番号 | 培地の種類                    |
|----|--------------------------|
| ①  | SH培地 (表3)                |
| ②  | 分離用培地 (表1)               |
| ③  | 培地② + Soil extract (10%) |
| ④  | 培地② + 活性汚泥抽出液 (10%)      |
| ⑤  | D培地 (表4)                 |
| ⑥  | 分離用培地* (表1)              |

\* 培地⑥では  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  濃度を0.05 g/lとした  
注) Extracted hay を培地1 l にそれぞれ10 g 投入

表3 SH培地

| 成分           | 分量      |
|--------------|---------|
| カタラーゼ        | 0.231 g |
| ビタミン液        | 1 ml    |
| Soil extract | 50 ml   |
| Hay extract  | 0.5 g   |

注) ・HEPES BufferでpH7.0～7.2に調整  
・イオン交換水で1 l に調整

表4 D培地

| 成分                                        | 分量       |
|-------------------------------------------|----------|
| $\text{CH}_3\text{COONa}$                 | 0.005 g  |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 0.1 g    |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g    |
| $\text{FeCl}_3$                           | 0.05 g   |
| 微量元素                                      | 0.025 ml |

注) ・HEPES BufferでpH7.0～7.2に調整  
・イオン交換水で1 l に調整

〔微量元素〕

| 成分                                        | 分量      |
|-------------------------------------------|---------|
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 2.28 g  |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 g   |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                   | 0.5 g   |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.045 g |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 g |
| $\text{H}_2\text{SO}_4$                   | 0.5 ml  |

注) イオン交換水で1 l に調整

表5 各種炭素源による *Beggiatoa* と雑菌の増殖

| 炭素源     | 濃度 (%) | 増殖状況             |    |
|---------|--------|------------------|----|
|         |        | <i>Beggiatoa</i> | 雑菌 |
| 酢酸ナトリウム | 0.1    | ++               | ++ |
|         | 0.01   | ++               | +  |
|         | 0.001  | +                | +  |
| 乳酸ナトリウム | 0.1    | —                | —  |
| エタノール   | 0.1    | ++               | +  |
|         | 0.01   | +                | ++ |

++ 大量に増殖、+ 少し増殖、— 増殖せず

表6  $\text{NaN}_3$  によるマット洗浄の影響

| $\text{NaN}_3$ (%) | <i>Beggiatoa</i> の増殖頻度 | 増殖状況             |    |
|--------------------|------------------------|------------------|----|
|                    |                        | <i>Beggiatoa</i> | 雑菌 |
| 1.0                | 0/15                   | —                | —  |
| 0.5                | 0/15                   | —                | —  |
| 0.1                | 8/15                   | +                | +  |
| 0.05               | 7/15                   | +                | +  |
| 0.01               | 11/15                  | ++               | ++ |
| 0.005              | 14/15                  | ++               | ++ |

++ 大量に増殖、+ 少し増殖、— 増殖せず  
増殖頻度 =  $\frac{\text{Beggiatoa の増殖が確認された試験数}}{\text{全試験数}}$