

活性汚泥からの酢酸資化性リン除去菌の単離

九州大学大学院 工学府 学生会員 ○ 金山拓広 学生会員 浜田康治
正会員 久場隆広 フェロー 楠田哲也

1. はじめに

湖沼や内湾などの閉鎖的水域で問題となっている富栄養化を防止するために下水処理場においてリンを除去することは有効な手段の一つであり、現在種々の高度処理が導入されつつある。特にその中でも処理コストの低さなどから、生物学的リン除去の研究が進められている。活性汚泥中のリン除去菌がリン酸塩を細胞内に過剰摂取し、ポリリン酸(poly-P)として蓄積することにより生物学的リン除去は達成される。生物学的リン除去を担う菌を単離し、その生理学的特性を明らかにすることは、下水処理場における生物学的リン除去工程の最適化に有用である。本研究ではリン除去能を有している活性汚泥を嫌気-無酸素連続回分条件によりスクリーニングし、生物学的リン除去を担う菌の集積・単離を試みた。

2. 実験方法

2.1 集積・単離方法・・・本研究では嫌気-無酸素連続回分スクリーニング装置(以下単にスクリーニング装置)を作製し、集積・単離操作に用いた。まずリン除去能を有した活性汚泥を分散し、ろ過によりメンブレンフィルタ上に固定した。そのフィルタをスクリーニング装置本体内に設置した。図-1にスクリーニング装置の嫌気工程から無酸素工程への遷移過程を段階的に示した。嫌気工程では酢酸塩を主な有機物とした基質をろ紙が浸るまで充填し、約3時間嫌気状態を保持した。嫌気工程から無酸素工程へ移行させる際、窒素ガスを送入しながら滅菌した蒸留水でフィルタを洗浄し、嫌気基質を完全に除去した。その後硝酸塩を主成分とする無酸素基質で充填させ、約3時間無酸素状態を保持した。無酸素から嫌気工程への遷移過程も嫌気から無酸素工程と同様な段階的手法を用いた。このサイクルを1日4回、数ヶ月に渡って繰り返し、フィルタ上にコロニーを形成させた。得られたコロニーを滅菌水に懸濁させ、LB Broth + 寒天培地に植菌し、30℃で1日間培養した。培養により得た菌体からDNAを抽出し、PCR法により16S rDNA領域のうち5'末端側約500bpをシーケンスし、塩基配列を得た。菌体の帰属分類群を推定するため、得られた16S rDNA配列から相同性検索により近縁と考えられる種を特定した。

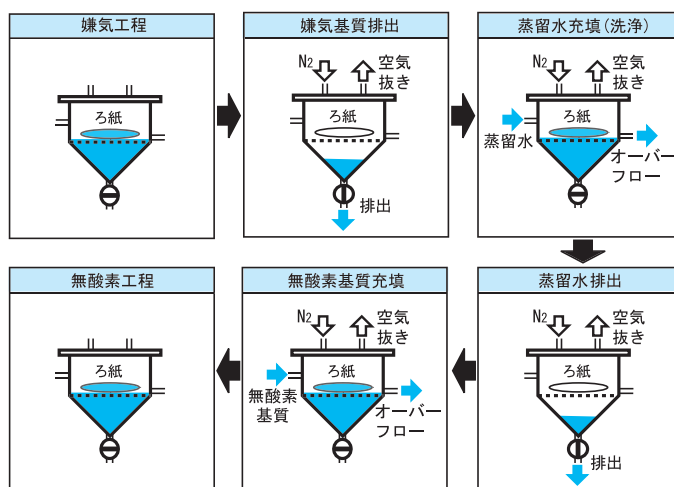


図-1 嫌気工程から無酸素工程への遷移過程

このサイクルを1日4回、数ヶ月に渡って繰り返し、フィルタ上にコロニーを形成させた。得られたコロニーを滅菌水に懸濁させ、LB Broth + 寒天培地に植菌し、30℃で1日間培養した。培養により得た菌体からDNAを抽出し、PCR法により16S rDNA領域のうち5'末端側約500bpをシーケンスし、塩基配列を得た。菌体の帰属分類群を推定するため、得られた16S rDNA配列から相同性検索により近縁と考えられる種を特定した。

2.2 定性実験

(a) 嫌気-無酸素連続回分条件下における poly-P・PHB 蓄積能の検討・・・得られた単離菌を上述のスクリーニング装置に再度投入し、染色法により定性的に poly-P・PHB 蓄積活性を示すか否かを検討した。実験に供した純菌は、単離後に改めて有機物存在下で好氣的に前培養したものである。装置投入前及び投入して14日後に poly-P・PHB 染色を施し、蓄積活性を確認をした。

(b) 嫌気条件下及び無酸素条件下における poly-P・PHB 代謝活性の確認・・・(a)でのスクリーニング装置投入後14日に装置内より採取した、あらかじめリン除去活性が誘導されて体内に poly-P・PHB を蓄積している純菌を実験に供した。この採取した菌及びさらに過剰な酢酸塩を添加し6時間嫌気条件に曝した菌、また嫌気条件後さらに硝酸塩を添加し12時間無酸素条件に曝した菌に対してそれぞれ poly-P・PHB 染色を施した。染色結果を比較することで、得られた単離菌が嫌気条件下及び無酸素条件下においてどのような poly-P・PHB 代謝活性を示すかを定性的に検討した。

3. 実験結果及び考察

3.1 集積・単離結果・・・リン除去能を有した活性汚泥からのスクリーニングの結果、3種の菌が得られた。それらの純菌は16S rDNA解析の結果、*Stenotrophomonas acidaminiphila*近縁種、*Pseudomonas fulva*近縁種、*Acinetobacter johnsonii*近縁種であった。得られた3種の単離菌はすべて系統分類学的にはγ-Proteobacteriaに帰属している。分子生物学的手法を用いた報告では、γは活性汚泥中の占有率がそれほど高くはないとするものもある。現在、分子生物学的・遺伝子学的手法により生物学的リン除去を担う菌ではないかと指摘されている *Rhodocyclus* 属はβ-Proteobacteriaに属しているが、実際に単離された菌ではなし、遺伝子学的に生物学的リン除去を担う菌ではないかと推定されているに過ぎない。また、グルコースを利用し、リンの放出・摂取の可能な *Microlunatus phosphovor* NM-1株はActinobacteria

キーワード：活性汚泥、リン除去菌、単離、酢酸塩、嫌気-無酸素、栄養塩除去

連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1 九州大学 工学部4号館(水工) TEL: (092)-642-3303 FAX: (092)-642-3322

に属している。NM-1株に関しては嫌気条件下においてグルコース資化活性を示しているが酢酸資化活性は示さず、実際の下水処理場における生物学的リン除去を担う菌の優占種であるとは考えにくい。このように、これまで酢酸資化能を有するリン除去菌の単離を報告した例は無い。

3.2 定性実験結果・・・表-1

表-1 poly-P・PHB 染色の結果

	poly-P / BIOMASS [%]				PHB / BIOMASS [%]			
	AA連続 回分装置 投入時 (a)	回分実験 (装置投入後14日目)			AA連続 回分装置 投入時 (a)	回分実験 (装置投入後14日目)		
		回分実験 初期 (b)	嫌気 工程後 (c)	無酸素 工程後 (d)		回分実験 初期 (b)	嫌気 工程後 (c)	無酸素 工程後 (d)
<i>S.acidaminiphila</i> 近縁種	0 (0 - 1)	48 (41 - 54)	3 (1 - 4)	16 (12 - 20)	3 (2 - 5)	42 (39 - 45)	78 (76 - 81)	57 (53 - 62)
<i>P.fulva</i> 近縁種	5 (0 - 13)	28 (26 - 31)	15 (3 - 27)	14 (8 - 20)	20 (7 - 32)	49 (36 - 63)	81 (77 - 84)	67 (60 - 74)
<i>A.johnsonii</i> 近縁種	35 (24 - 46)	29 (23 - 36)	22 (15 - 29)	23 (17 - 29)	60 (54 - 66)	68 (65 - 72)	77 (74 - 81)	59 (56 - 62)

に、得られた3種の菌に対してそれぞれpoly-P・PHB染色を施した結果をまとめた。写真-1は結果の中から特徴的であった*P. fulva*近縁種のpoly-P染色結果(表-1淡青色部)である。写真の中で黒色に染まっている部分がpoly-P及びPHBである。淡赤色に染まっている部分は菌の細胞質である。また表-1の数値は染色写真をフィルタを用いて画像を3元化し、poly-PあるいはPHB及び菌の細胞質の面積をもとめ、菌の細胞中のpoly-P・PHB含有率を算出したものである。

装置投入時の初期状態においては*A. johnsonii*近縁種だけがpoly-P・PHBともにすでに蓄積しており、*S. acidaminiphila*近縁種・*P. fulva*近縁種はほとんど蓄積していなかった。しかしながら嫌気-無酸素連続回分条件に14日曝した後は、3種ともpoly-P・PHBを明らかに蓄積していた。

回分実験初期(装置投入後14日)及びさらに酢酸塩を添加した嫌気工程後、また嫌気工程後に硝酸塩を添加した無酸素工程後にそれぞれpoly-P・PHB染色を施した。結果から3種の単離菌の嫌気条件下及び無酸素条件下におけるpoly-P・PHB代謝活性を検討した。連続回分装置によりあらかじめリン除去活性が誘導されていた3種の単離菌は酢酸塩を唯一の有機物とする嫌気条件下において、菌体内のpoly-Pを分解し、PHBを蓄積した。続く無酸素条件下では3種の菌ともPHBを分解した。しかしながら*S. acidaminiphila*近縁種は明らかにpoly-Pを蓄積したが、*P. fulva*近縁種・*A. johnsonii*近縁種はpoly-P蓄積量に変動がほとんど認められなかった。

3.3 考察・・・活性汚泥中の生物学的リン除去を担う菌は嫌気-好気(無酸素)連続回分条件において次のような代謝機構を示すとされている。嫌気条件下で有機物を摂取するエネルギーを得るため、細胞内のpoly-Pを加水分解し、摂取した有機物をPHBとして細胞内に蓄積する。逆に好気(無酸素)条件下では細胞内のPHB分解に伴い細胞外からリン酸塩を過剰摂取し、poly-Pとして細胞内に蓄積する。

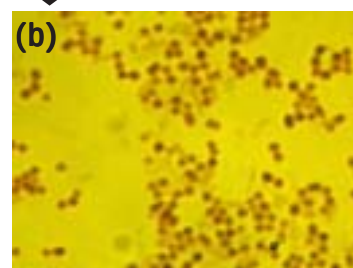
本研究では嫌気条件下で生物学的リン除去を担う菌が最も好むといわれる酢酸塩を唯一の有機物とし、嫌気条件下でのみ酢酸塩を存在させ、嫌気-無酸素連続回分条件に曝した。この条件では電子受容体と電子供与体が同時に基質中に存在しないため、生物学的リン除去を担う菌のように特異的な代謝機構を備えもつ菌以外の生存は難しい。したがって、この嫌気-無酸素連続回分条件下でpoly-P及びPHB蓄積活性を示し、さらに嫌気条件下において菌体内のpoly-Pを分解し、PHBを蓄積する活性を示す3種の単離菌は生物学的リン除去を担う菌である可能性が高いと、定性的ではあるが、判断できる。さらに続く無酸素条件下においてpoly-Pを蓄積し、かつPHBを分解する*S. acidaminiphila*近縁種は、特に、生物学的リン除去を担う菌である可能性が高いと考えられる。

4. おわりに

本研究ではリン除去能を有している活性汚泥を嫌気-無酸素連続回分条件に曝し、3種の単離菌を得た。3種の菌は嫌気-無酸素連続回分条件下でpoly-P・PHB蓄積活性を示し、さらに嫌気条件に曝すことで菌体内のpoly-Pを分解する活性を示すことから定性的には生物学的リン除去を担う菌であると判断できる。また続く無酸素条件下においてpoly-Pを蓄積し、かつPHBを分解する*S. acidaminiphila*近縁種は生物学的リン除去を担う菌である可能性が高いと考えられる。今後、さらに明確に生物学的リン除去を担う菌であると断言するためには嫌気-無酸素条件下におけるpoly-P・PHB代謝活性を定量的に確認しなければならない。



(a) AA連続回分(14日間)



(b) 嫌気工程(酢酸塩添加)



(c) 無酸素工程(硝酸塩添加)



写真-1 *P. fulva*近縁種のpoly-P染色結果