

## アスパラギン酸を炭素源として運転した 生物学的リン除去プロセスにおける微生物群集解析

東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻 学生会員 岡本真由子  
非会員 福島寿和、正会員 小貫元治、佐藤弘泰、味埜俊

### 1. 研究の背景及び目的

閉鎖性水域などの富栄養化が問題となっている昨今、栄養塩であるリンを除去することは重要な課題となっている。生物学的リン除去プロセスはすでに実用段階に入っているが、リン除去能の突然の低下、消失など不安定性が指摘されている。これらの原因解明の方法として、さらにはより効率的な処理プロセスの構築のためにも、代謝活性と処理を担っている微生物群集からプロセスを理解することが重要であると考えた。

これまで嫌気好気法による生物学的リン除去プロセスにおいてリン除去を担うポリリン酸蓄積細菌として *Rhodocyclus* 近縁種が酢酸を唯一の炭素源として馴養した系において多く報告されている。しかし酢酸以外を唯一の炭素源とした場合、同一種のポリリン酸蓄積細菌がリン除去を担っているのか、他の種のポリリン酸蓄積細菌がリン除去を担うかどうか明らかになっていない。

そこで本研究では嫌気好気法によってリン除去が良好な都市下水処理場の返送汚泥を種汚泥としてラボスケールでの生物学的リン除去プロセスを運転した。アスパラギン酸を唯一の炭素源として加え馴養し、その微生物群集の変化を PCR-DGGE 法で解析し、リン除去を担っているポリリン酸蓄積細菌の特定を行った。

### 2. 実験方法

#### 2.1 ラボスケールリアクター

容量 10L の連続回分式リアクターを実験室内に設置しアスパラギン酸を唯一の炭素源(TOC=8000mgC/L, P=640mgP/L)として嫌気好気活性汚泥を馴養した。90分嫌気、150分好気、60分汚泥沈降、排水放流、流入水及び基質添加の計6時間を1サイクルとして運転を行った。

#### 2.2 水質モニタリング

MLSS、MLVSS、DOC、TN、リン含有率、溶存リン酸イオン、酢酸、プロピオン酸、アスパラギン酸及

び PHA (ポリ ヒドロキシ脂肪酸) の測定を行った。MLSS は遠心分離法、MLVSS は強熱減量法、DOC 及び TN は NPOC 法 (TOC-V、Shimadzu)、リン含有率は T-P 及び D-P をペルオキシ二硫酸カリウム分解法、溶存リン酸イオン、酢酸、プロピオン酸及びアスパラギン酸はキャピラリー電気泳動(CIA、Waters)、PHA はクロロホルムにより抽出しガスクロマトグラフィ(GC-FID、Shimadzu) により測定し求めた。

#### 2.3 PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法

汚泥から核酸を Benzyl chloride 法により抽出し、得られた DNA から 16SrDNA の 341-534 領域を PCR 法によって増幅した。この PCR 産物を DGGE によって解析した。特に興味深いバンドについては切り出して DNA 断片を回収し、シーケンサー (ABI PRIZM 310、PE Applied Biosystems) によって塩基配列を解読し、既知種の中から最も相同性の高い塩基配列を DDBJ (DNA Data Bank of Japan) から BLAST (Basic local alignment search tool) を用いて検索し、最近縁配列を求めた。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 リン除去活性

嫌気でのリンの吐き出し量及び好気でのリンの取り込み量をリン除去活性を表す指標として、嫌気行程終了時と好気行程終了時の溶存リン酸イオンの経日変化を Fig.1 に示す。

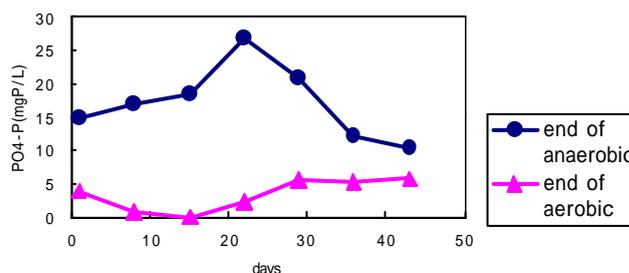


Fig.1 溶存リン酸イオンの経日変化

キーワード：生物学的リン除去プロセス、アスパラギン酸、代謝、PCR-DGGE 法、ポリリン酸蓄積細菌

連絡先：東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻 〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

馴致開始から徐々にリン除去活性が高まっていく様子が見られた。22日目において最もリン除去活性が良好であった。その後、29日目まで良好な状態が続いているが、36日目以降、徐々にリン除去活性の低下が見られ、43日目において運転を停止した。

### 3.2 代謝

リン除去が良好に維持されていた 29 日目において汚泥に吸収されたアスパラギン酸の収支を Fig.2 に示す。

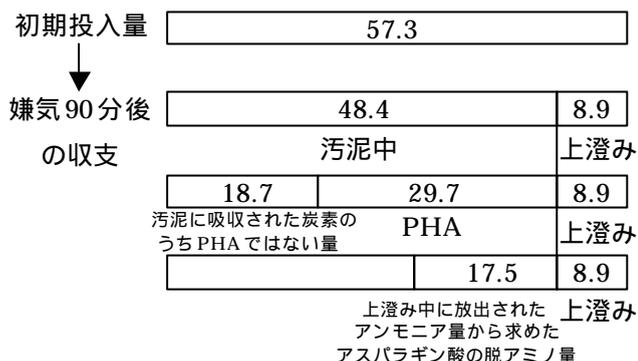


Fig.2 アスパラギン酸の収支 (単位: mgC/L)

上澄み中にアンモニアが検出されていることからアスパラギン酸の一部は脱アミノを通して代謝されると考えられる。しかし上澄み中に放出されたアンモニア量から求めたアスパラギン酸の脱アミノ量以上の PHA が得られた。また汚泥に吸収された炭素のうち PHA ではない炭素が存在し、この炭素は脱アミノされずに汚泥中に蓄積されていることが示唆される。このことは Satoh et al.(1998)の結果と一致する。

また上澄み中に溶存有機物が残存した。しかしアスパラギン酸や発酵生産物の酢酸、プロピオン酸は検出されなかった。

### 3.3 微生物群集解析

DGGE による群集解析の結果を Fig.3 に示す。Band-1 はリン除去が良好になってきた 15 日目以降現れていた。シーケンシングの結果、Proteobacteria 群の *Rhodocyclus* グループの配列に近縁な配列であることが分かった。*Rhodocyclus* 近縁種は酢酸を唯一の炭素源として馴養した系において多く報告されている。また酢酸を利用してポリリン酸を蓄積し、PHA を生成するとされているが、今回の実験において PHA の蓄積は確認されたが、酢酸は検出されなかった。

また Band-1 以外もリン除去が良好な時に相対的にバンド強度が増しているバンドがいくつかあり、例え

ば Band-2 がそれに当てはまる。このことから *Rhodocyclus* 近縁種は主要なポリリン酸蓄積細菌とは言えず、他のポリリン酸蓄積細菌が存在することが示唆される。アスパラギン酸の一部は脱アミノされずに代謝され、汚泥中に蓄積していることが確認されているので、そのような代謝を行うポリリン酸蓄積細菌を検索することが今後の課題である。

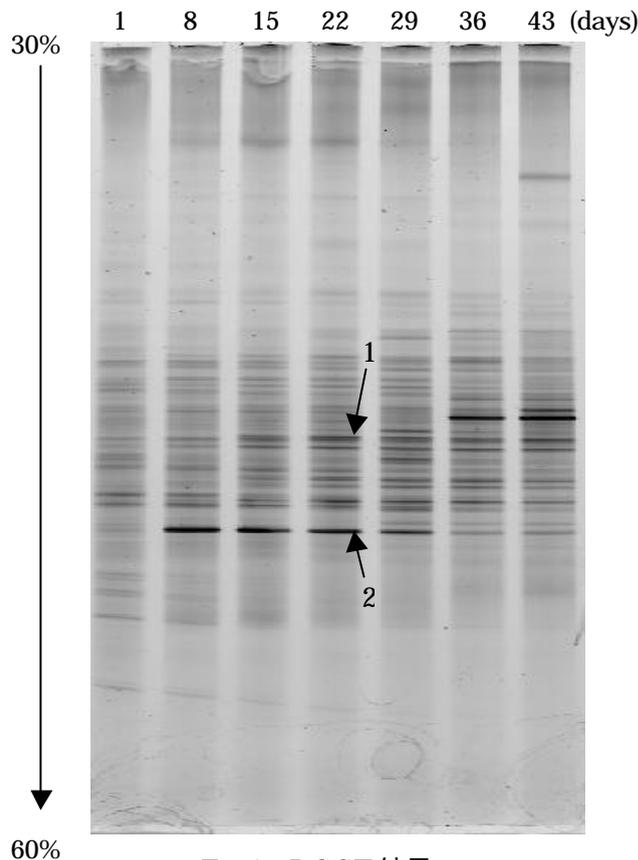


Fig.3 DGGE 結果

### 4. まとめ

アスパラギン酸を用いてリアクターを運転させたところ、ポリリン酸蓄積細菌として報告されている *Rhodocyclus* 近縁種の存在が確認された。しかしリン除去が良好な時に *Rhodocyclus* 近縁種以外バンドも現れており、このバンドの中に新たなポリリン酸蓄積細菌が存在する可能性が示唆される。今後さらなる解析を行い、アスパラギン酸を用いた生物学的リン除去プロセスの代謝と微生物種の間関係を解明する必要がある。

### 5. 参考文献

Satoh, H., Mino, T. and Matsuo, T. 1998, Anaerobic uptake of glutamate and aspartate by enhanced biological phosphorus removal activated sludge. Wat. Sci. Tech. 37(4-5) 579-582.