脱窒性脱リン細菌の集積と単離に関する検討

九州大学大学院　学生会員　肘井史朗　学生会員　金山拓広　学生会員　浜田康治
正会員　久場隆弘　フェロー　楠田哲也

1.　目的

生物学的廃水処理は多くの菌の相互作用により成り立っている。しかしながら、多くの菌が未だ単離されていない。より多くの菌を単離し、処理システム内での動的挙動を解明することは、処理システムの最適管理法確立のために重要である。未だ単離されていない菌として脱リン細菌が挙げられる。脱リン細菌は、嫌気-好気(もしくは無酸素)連続回分条件で培養すると、嫌気条件下においてリン酸塩を放出しながら有機物を摂取しPHBとして細胞内に蓄積する。また、好気(もしくは無酸素)条件下においてリン酸塩を過剰摂取しながらポリリン酸として細胞内に蓄積する。金山ら(2003)は新たに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、脱窒性脱リン菌の集積・単離を試みた[1)]。その結果、*Stenotrophomonas acidaminiphila*近縁種および*Pseudomonas fulva*近縁種、*Acinetobacter johnsonii*近縁種の3菌を単離した。これらの単離菌はポリリン酸及びPHB蓄積活性を定性的には示したが、脱窒性脱リン細菌が示すとされるリン酸塩の放出・摂取といった代謝活性を示さなかった。そこで今回、スクリーニング手法を改良し、新たにスクリーニングを行い、得られた単離菌の特性評価を試みた。

2.　内容

2.1　スクリーニング装置を用いた脱リン細菌の集積

実下水を用いたDephanox型(嫌気-好気-無酸素法)実験プラントより、リン除去活性を示す活性汚泥を採取した。汚泥をろ過することによりメンブレンフィルタ上に固定させた。そのフィルタをスクリーニング装置内に設置した後、嫌気工程3時間・無酸素工程3時間の嫌気-無酸素連続回分条件に数週間曝し、フィルタ上にコロニーを形成させた。唯一の炭素源として嫌気工程用基質にのみ酢酸塩を添加した。無酸素工程用基質は硝酸塩を主成分とした。

2.2　菌の分離および塩基配列決定

数週間のスクリーニング作業により得られたコロニーを寒天上に設置したメンブレンフィルタに植菌し、30℃で数日間静置培養した。培養された菌体をDNA抽出の供試菌体とし、ゲノムDNAを抽出して16S rDNA塩基配列を決定した。得られた塩基配列を用いて相同性を検索し、近縁種を推定した。上述の作業を2回試みた結果、培養された菌体の16S rDNAはそれぞれ、*Burkholderia cepacia*、*Vogesella indigofera*、*Pseudomonas alcaligenes*、および、*Chelatococcus asccharovorans*の16S rDNAと最も相同性が高かった。分子系統樹上でも単離菌の16S rDNAはそれぞれ*B.cepacia*、*V.indigofera*、*P.alcaligenes*、および、*C.asccharovorans*の16S rDNAとクラスターを形成し、近縁種であることが示された。

2.3　嫌気-無酸素連続回分条件下における単離菌の代謝活性確認実験

得られた単離菌の代謝活性を確認するために、バイアル内で嫌気工程3時間・無酸素工程3時間の連続回分実験を2サイクルにわたり実施した。菌体量を増加させるため、実験には担体上に付着させた単離菌を用いた。実験に供する前に、1週間をかけて好気的に単離菌を担体上に十分に増殖させた。その担体を約2週間スクリーニング装置に投入し、単離菌のリン除去活性をあらかじめ誘導させた。回分実験中は経時的に装置内の液相をサンプリングし、リン酸塩および酢酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩濃度を測定した。嫌気工程用基質の酢酸塩濃度を20[mg-C/L]、無酸素工程用基質の硝酸塩濃度を14[mg-N/L]、リン酸塩濃度は両基質ともに10[mg-P/L]とした。また、酢酸塩と硝酸塩を同時に添加した脱窒活性の確認実験も実施した。さらに、実験開始時および嫌気工程終了時、無酸素工程終了時の単離菌に対してポリリン酸およびPHB染色を施した。ポリリン酸染色にはGoharのボルチン顆粒

表1　これまでに得られた単離菌の特性

	class*	poly-P蓄積活性	PHB蓄積活性	脱リン活性	内生的脱窒活性	脱窒活性
*S.acidaminiphila*近縁種	γ	+	+	−	−	−
*P.fulva*近縁種	γ	+	+	−	−	+
*A.johnsonii*近縁種	γ	+	+	−	−	−
*B.cepacia*近縁種	β	−	+	−	−	−
*V.indigofera*近縁種	β	UD	UD	UD	UD	UD
*P.alcaligenes*近縁種	γ	UD	UD	UD	UD	UD
*C.asccharovorans*近縁種	α	UD	UD	UD	UD	UD

*:全てProteobacteria、+:有、−：無、UD：未確認

キーワード　活性汚泥、脱リン細菌、ポリリン酸、PHB、嫌気-無酸素
連絡先　九州大学大学院　都市環境工学研究室　〒812-8581　福岡県福岡市東区箱崎6-10-1　TEL 092-642-3303

染色法を、PHB染色にはズダン染色シリーズのBurdon法を用いた。表1は、得られた単離菌に対する代謝活性確認実験の結果をまとめたものである。単離菌のなかにはポリリン酸・PHB蓄積活性を定性的に示すものも存在したが、嫌気条件下でのリン酸塩の放出および無酸素条件下でのリン酸塩の過剰摂取といった脱リン細菌が示すとされる代謝活性を定量的には示さなかった。この結果の要因として、今回の実験ではスクリーニング期間が短かったため脱リン細菌が系内で優占し得なかったことやスクリーニング過程で菌が流出してしまった可能性、また、嫌気的な酢酸塩の消費が認められることから、嫌気工程用基質に添加されている硫酸塩による硫酸還元反応の影響の可能性が挙げられる。

これまでに得られた単離菌は脱窒脱リン活性を示さなかった。本来、この様な嫌気-無酸素連続回分条件下において生存可能な細菌は少ないと考えられるが、実際には、様々な代謝機構を有する細菌が存在し、この様な条件下でも存在し得る細菌が集積・単離されたものと推察された。したがって、脱リン細菌を確実に単離するためには、スクリーニング作業、または、それに続く分離作業を再考する必要がある。そこでまず、スクリーニング装置内の環境が意図したものになっているか否かを確認するために以下の実験を実施した。

2.4　スクリーニング条件の確認実験

まず、Dephanox 型実験プラントより、非常に高いリン除去活性を示す活性汚泥を採取した。汚泥を担体とともに遠心分離することにより、物理的に汚泥を担体に付着させた。その担体をスクリーニング装置内に投入し、嫌気工程 3 時間・無酸素工程 3 時間の嫌気-無酸素連続回分条件に曝した。嫌気工程開始時・終了時および無酸素工程開始時・終了時に装置内の液相をサンプリングし、リン酸塩および酢酸塩、硝酸塩・亜硝酸塩濃度を測定し、脱窒脱リン活性を確認した。図 1 に、実験開始 36 日後における代謝活性確認実験の結果を示す。また、写真 1・2 に装置内の菌群に対して施したポリリン酸・PHB 染色の結果を示す。装置内の菌群は酢酸塩の摂取、さらに嫌気条件下におけるリン酸塩の放出および無酸素条件下におけるリン酸塩の摂取といった典型的な代謝活性を示した。また、内生的な脱窒活性も確認できた。染色の結果から、装置内の菌群は明らかにポリリン酸・PHB 蓄積能を有していることが確認できた。

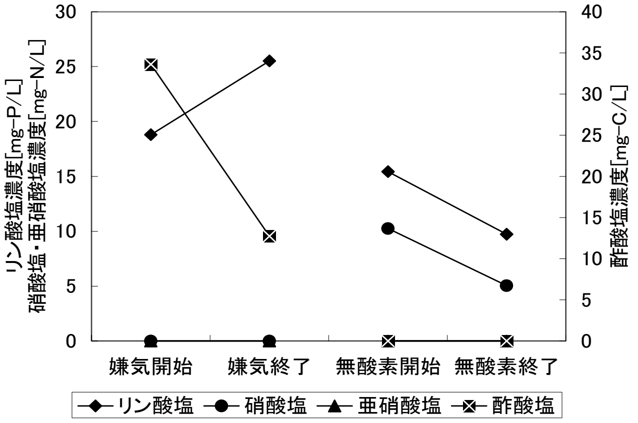

図 1　新規スクリーニングにおける代謝活性確認実験（開始 36 日後）

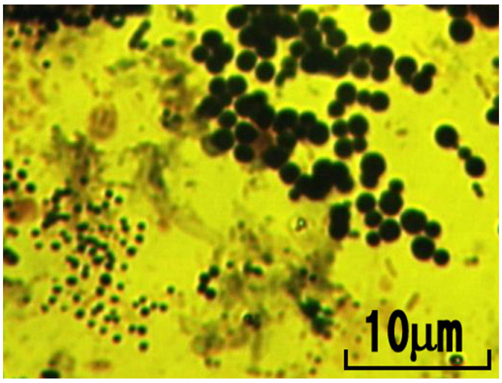

写真 1　ポリリン酸染色結果

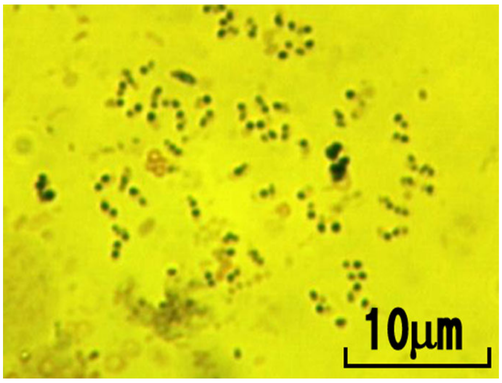

写真 2　PHB 染色結果

3.結論および展望

2.4 の実験結果から、スクリーニング手法には問題がなく、装置内には確実に脱窒性脱リン細菌が集積・培養されていることが確認できた。したがって、スクリーニング作業後の分離手法についてさらなる検討が必要である。今後は、遺伝子工学的手法を用いて装置内の菌相を把握する予定である。β-Proteobacteria に属する菌の中に脱リンを担う菌が存在するであろうとされている。β-Proteobacteria に特異的な蛍光オリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH による観察から、高いリン除去活性を示す活性汚泥中の全菌の約 9 割をβ-Proteobacteria が占める、との報告もある [2)]。したがって、今後は、β-Proteobacteria や脱リン細菌である可能性が高いと考えられている Rhodocyclus[2)] に特異的なプローブを用いて、装置内の菌群に対して FISH による観察を行い、装置内の菌相をある程度把握する。さらに、その結果を踏まえた上で、分離作業に用いる初期植種菌体量や、分離期間、分離環境、分離作業に用いる培地の成分などを検討し、脱窒性脱リン細菌の単離を試みる。

[参考文献]

1）金山ら（2003）；活性汚泥からの酢酸資化性リン除去菌の単離, *土木学会全国大会*, Ⅶ-096

2）L.L.BLACKALL et al. (2000) Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and Design of 16S rRNA-Directed Probes for Their Detection and Quantitation, *Appl. Environ. Microbiol.*, Mar.,pp.1175-1182.