

嫌気-無酸素連続回分スクリーニングにより活性汚泥から得られた単離菌の特性評価

九州大学工学部 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 久場隆広 フェロー 楠田哲也

1. はじめに

生物学的廃水処理は数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に脱リン菌が存在する。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。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。全てγ-Proteobacteriaに属する菌であった。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、脱窒性リン除去菌が示すとされるリンの放出・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、得られた菌の特性評価を試みた。

2. 実験方法

2.1 スクリーニング操作

実下水を用いたDephanox型実験プラントより、リン除去能を有する活性汚泥を採取した。金山らの手法と同様に、汚泥の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内に設置したあと、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約10日間さらし、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、リン除去菌が最も好むとされる酢酸塩を添加した。無酸素工程用基質は硝酸塩を主成分とした。嫌気工程から無酸素工程への遷移過程では、本体内部から嫌気工程用基質を流出させた後、蒸留水を流入させた。フィルタを蒸留水に数分間浸しフィルタを洗浄した。蒸留水を流出させた後、共洗いのため無酸素工程用基質を充填した。蒸留水と同じようにフィルタを基質に数分間浸した。最後にもう一度無酸素工程用基質を充填し、無酸素工程を開始した。その間、装置内部に窒素ガスを注入し、酸素の混入を防いだ。無酸素工程から嫌気工程への遷移過程においても、同様の手法を用いた。

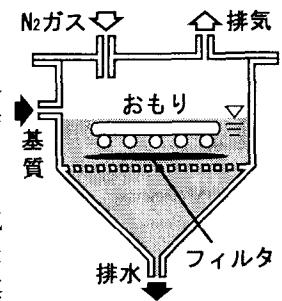


図1 スクリーニング装置

図1にスクリーニング装置を示している。金山らの手法からの改善点は大きく下記の3点である。(1)洗浄・共洗い工程の回数を多くしたこと。(2)金山らの手法ではフィルタが水面に浮上する場合も見られていたが、今回は重りで水中に沈めたこと。(3)スクリーニングの期間を10日と短くしたことにより、貧栄養条件下で生存できる菌の増殖を防ぐこと。これらにより、リン除去活性を示す菌を優先的に単離できると判断した。

2.2 菌の分離および塩基配列決定

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置いたメンブレンフィルタに植菌し、30℃で2日間静置培養した。この菌体を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検索を行い、菌種を推定した。

2.3 嫌気-無酸素条件下における代謝活性確認実験

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6時間の連続回分実験を行った。実験には担体に付着させた単離菌を用いた。実験に供する前に、1週間かけて単離菌を担体に十分に付着させた。その担体を約2週間スクリーニング装置に投入し、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サンプリングを行い、酢酸塩およびリン酸塩・硝酸塩・亜硝酸塩濃度を測定した。本実験で用いた基質の組成は、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](1[mM])、リン酸塩濃度は両基質ともに10[mg-P/L]とした。嫌気工程から無酸素工程への遷移工程では、担体をバイアルから取り出し、蒸留水を用いて洗浄した。その後、担体を無酸素工程用基質とともにバイアルに再度投入した。その後、窒素ガスを用いて脱気し、無酸素工程を開始した。無酸素工程から嫌気工程への遷移工程においても、同様の手法を用いた。また、酢酸塩と硝酸塩を同時に添加した実験も行った。

さらに、実験開始時および嫌気工程終了時・無酸素工程終了時にポリリン酸および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。

3. 結果および考察

3.1 集積・単離結果

非常に高い脱窒脱リン活性を示す活性汚泥を用いたスクリーニングおよび分離作業の結果、1種の単離菌を得た。16S rDNA塩基配列を用いた相同性検索の結果、*Burkholderia cepacia*の16S rDNAに対し最も類似性が高かった。分子系統樹上でも単離菌の16S rDNAは*B. cepacia*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。

3.2 嫌気-無酸素条件下における代謝活性確認実験

図2は単離菌の代謝活性確認実験の結果である。嫌気-無酸素連続回分条件で2サイクル実施した。単離菌は酢酸塩摂取能を有していた。しかし、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リン除去菌が有するとされる代謝活性を示さなかった。硝酸塩濃度にも有意な変化がなく、内生的な脱窒活性も示さなかった。また、PHB染色の結果においては、回分実験を通してPHBを蓄積している様子が確認できたが、ポリリン酸染色の結果においては、ポリリン酸を蓄積している様子は確認できなかった。

酢酸塩と硝酸塩を同時に添加した実験においても、脱窒活性を示さなかった(結果は示していない)。

3.3 考察

*B. cepacia*近縁種はβ-Proteobacteriaに属する菌である。脱リン菌はグラム陽性で高G+C含量の菌であるとされている。その中でも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の特異的なDNAプローブを用いたFISHによる観察から、β-ProteobacteriaはEBPR活性汚泥中の全菌の約9割を占めるとされている菌群である、との報告もある。

金山らのスクリーニング手法を改良し、新たにスクリーニングを試みたが、生物学的リン除去を担う活性をもつ菌は得られなかった。単離菌は、嫌気条件下で酢酸塩を摂取しているにもかかわらず、内生的に脱窒活性を示さなかった。また、定性的なポリリン酸蓄積活性も示さなかった。この結果には、様々な要因があると考えられる。まず、数種の菌が単離されることを期待したが、結果としては1種しか得られなかった。この理由として、今回の実験では、スクリーニング時間が約10日と非常に短かったため、リン除去菌が系内で優先することができなかったこと、スクリーニング装置に投入した活性汚泥の初期菌体量が非常に低かったため、スクリーニングの過程で菌が流出してしまった可能性が挙げられる。その他の要因として、代謝活性実験の嫌気工程において、嫌気的な酢酸塩の消費が観察されたことから、嫌気工程用・無酸素工程用の両基質に添加されている硫酸塩(0.36[mM])による硫酸還元反応の影響の可能性も挙げられる。

4. おわりに

嫌気-無酸素連続回分スクリーニング法により生物学的リン除去活性をもつ菌の単離を試みた。単離菌が得られ活性確認実験を行ったが、生物学的リン除去代謝活性を示さなかった。脱リン菌は、活性汚泥を構成する他の微生物に比較して、増殖速度が遅いと報告もある。その後さらに、上述の考察も踏まえた改良点を加えて、スクリーニング開始時にフィルタに固定する菌体量を増やした。スクリーニング作業による集積・単離を、1ヶ月にまで延長して実施した。その結果、現在新たに9つのコロニーが得られている。今後は、これらのコロニーから菌種を推定し、得られた単離菌のポリリン酸・PHB蓄積能を確認する定性的な実験、また、嫌気条件下でのリン酸塩の放出およびPHBの蓄積、無酸素条件下でのリン酸塩の過剰摂取といったリン除去菌が有するとされる代謝活性を示すかどうかといった定量的な実験を進めていく予定である。

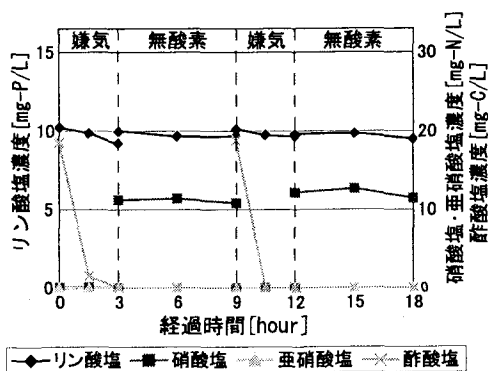


図2 代謝活性確認実験