

嫌気-無酸素連続回分スクリーニング法によるリン除去菌の単離

九州大学工学部 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。生物学的リン除去は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達成される。生物学的リン除去を担う菌を単離し、また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を最適化するのに有用である。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でろ紙が浸るまで充たし、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蒸留水にフィルタを浸し、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たし、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

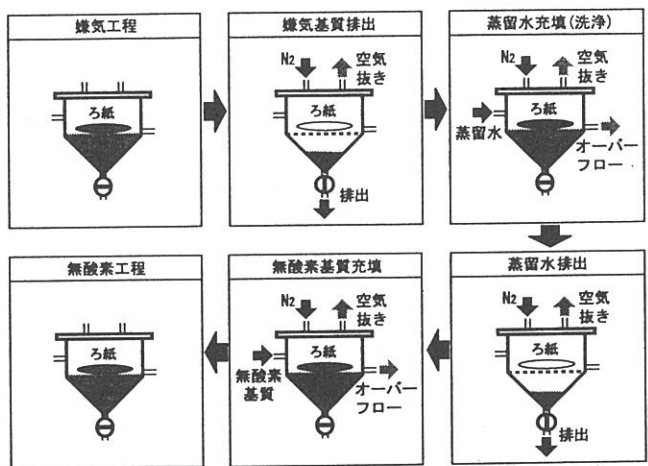


図-1 嫌気工程から無酸素工程への遷移過程

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す、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ゲノムを抽出し、PCR法により16S rDNAのうち5'末端側約500bpの領域をシーケンスし、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配列から近縁と考えられる種の同源性検索を行った。

2.2 定性実験・・・得られた単離菌を集積・単離操作で用いた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。実験に供した菌は、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、蓄積活性の確認を行なった。poly-P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法を使用した。

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種のグラム陰性菌が得られた。それらの純菌に対して16S rDNA解析した結果、*Stenotrophomonas acidaminiphila*、*Pseudomonas fulva*近縁種、*Acinetobacter johnsonii*近縁種の3種のグラム陰性菌であることが分かった。*S. acidaminiphila*はUpflow Anaerobic Sludge Blanket(UASB)から採取した汚泥より単離された菌であり、嫌気条件下においてPHB蓄積活性があるという報告がある。また得られた3種の単離菌はすべて系統分類学的にはγ-Proteobacteria網に帰属している。現在、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いわれている

Rhodocyclus 属は β -*Proteobacteria* 網に属している¹⁾。しかし *Rhodocyclus* 属は実際に単離された菌ではなく、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、摂取の特性を示す *Micrococcus phosphovorans* NM-1 株は *Actinobacteria* 網に属している²⁾。NM-1 株に関しては嫌気条件においてグルコース資化能は有しているが酢酸資化能は有しておらず、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先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全く無い。

3.2 定性実験結果・・・表-1に、得られた3種の菌についてスクリーニング装置投入前及び投入して14日後にそれぞれ poly-P 染色・PHB 染色を施した結果をまとめた。写真-1は、その結果の中から特徴的であった *Pseudomonas fulva* 近縁種の初期状態と14日後の染色結果である。写真の中で濃く染まっている部分が poly-P (写真 1-a, b) 及び PHB (写真 1-c, d) である。薄く染まっている部分は菌の細胞質である。初期状態においては poly-P は3種とも蓄積していなかった。PHB は *A. johnsonii* 近縁種だけがすでに蓄積していた。しかしながら嫌気-無酸素連続回分条件に14日曝した後の結果においては、3種とも poly-P・PHB を明らかに蓄積していた。

活性汚泥中の生物学的リン除去を担う菌は下記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 分解に伴い細胞外のリン酸塩を過剰摂取し、poly-P として細胞内に蓄積する。このように poly-P・PHB は生物学的リン除去において重要な物質である。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。この条件下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 蓄積活性を示す3種の単離菌は定性的に生物学的リン除去を担う菌である可能性が高い。

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すことによって、3種の単離菌を得ることができた。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考えられる。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 活性を定量的に確認しなければならない。

参考文献

- 1) 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., 1175-1182.
- 2) K. NAKAMURA *et al.* (1995) Some Factors Which Affect the Phosphorus Uptake of a Phosphorus Accumulating Bacterium, Strain NM-1, *J. Fermentation and Bioengineering*, Vol. 79, No. 2, 190-192.

表-1 PHB 染色・ポリリン酸染色の結果

	poly-P staining		PHB staining	
	initial	after 14 days	initial	after 14 days
<i>S. acidaminiphila</i>	-	++	-	++
<i>P. fulva</i> -related	-	++	-	+++
<i>A. johnsonii</i> -related	-	++	+	++

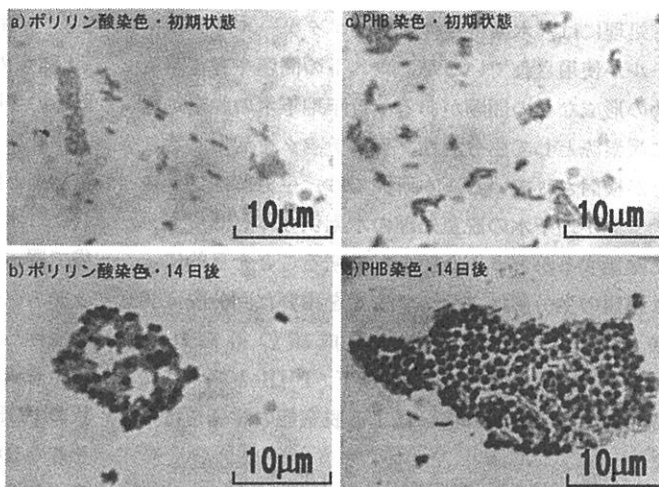


写真-1 *P. fulva* 近縁種のポリリン酸・PHB 染色の結果