

# 酢酸とプロピオン酸を炭素源とした脱窒性脱リン細菌の高濃度集積と単離の試み

九州大学工学部 学生会員 ○永淵慶彦 学生会員 中村圭一  
正会員 久場隆広

## 1. はじめに

湖沼、内湾等の閉鎖性水域での富栄養化現象の解決のためには下水処理場において窒素・リンを取り除くことが有効な手段である。現在種々の高度処理のなかでも、処理コストの低さ等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多くの菌の相互関係により成り立っている。しかし、多くの菌が未だ単離されていない。肘井(2006)<sup>1)</sup>は下水から窒素・リンを同時除去可能な脱窒性脱リン細菌の集積・単離を試みた。しかし、脱窒性脱リン細菌の単離には至らなかった。そこで今回、脱窒性脱リン細菌と競合し、EBPR(Enhanced Biological Phosphorus Removal)活性の低下の原因と考えられる菌であるGAOs(Glycogen Accumulating Organisms)の増殖の抑制を行い、PAOs(Polyphosphate Accumulating Organisms)の高濃度集積を試みると共に、脱窒性脱リン細菌の単離を目指す方法を試みた。

## 2. 実験方法

### 2.1 スクリーニング操作

肘井らの手法と同様に、活性汚泥を遠心分離装置により物理的にプロピレン製付着固定型担体に固着させた。その担体をスクリーニング装置本体(S1)に投入したあと、嫌気工程2時間、無酸素工程4時間の1サイクル6時間の嫌気-無酸素連続回分条件に晒した。スクリーニング装置に流入する唯一の炭素源として酢酸を嫌気工程用基質にのみ添加した。無酸素工程用基質の主成分は硝酸塩とした。この条件で長期的に運転し、3割程度のPAOsである *Rhodocyclus* 属を集積できた(図2参照)。一方、寒天培地上にはPAOsのコロニーは形成されなかった。

そこで、さらにPAOsの高濃度集積を目指して炭素源をプロピオン酸に変更した。プロピオン酸を用いることでGAOsであると考えられている *Competibacter* を抑制するという報告があったためである<sup>2)</sup>。まず、少量の担体に菌を付着させ、炭素源をプロピオン酸に変更して別のスクリーニング装置内(S2)で2週間程度運転した。その結果、図2のような結果が得られたため、装置S1の運転においても炭素源をプロピオン酸に変更して運転した。

### 2.2 菌の分離

肘井らの行った寒天培地上での分離培養ではPAOsの分離には至らなかった。培養可能な微生物の生産する生育促進化合物を培地中に添加することにより、通常の栄養培地等では生育できない(または極めて生育が遅い)微生物を分離培養できるという報告がある<sup>3)</sup>。そこで本実験では、基質(表1)と活性汚泥上清をいくつかの割合で混合した。寒天濃度は1.0%とした。そこにスクリーニング操作で集積・培養した菌を、活性汚泥上清を添加した寒天培地上に植菌し、好気条件下で培養してコロニーの形成を試みた。用いる活性汚泥上清は福岡市東部下水処理場の汚泥(AO法の好気槽)の上澄みをオートクレーブにより滅菌処理した後、紫外線に一日晒した。そこに活性汚泥上清をいくつかの条件で添加し、その影響を見た(条件は表2参照)。

### 2.3 微生物群集構造解

FISH法によりS1,S2装置内の微生物群集構造解析を行った。プローブはGAM42a、BET42a、PAO651、RHX991、GAOQ989を用いた。全菌に対してはDAPI染色を用いた。ポリリン酸染色にはGoharのボルチン

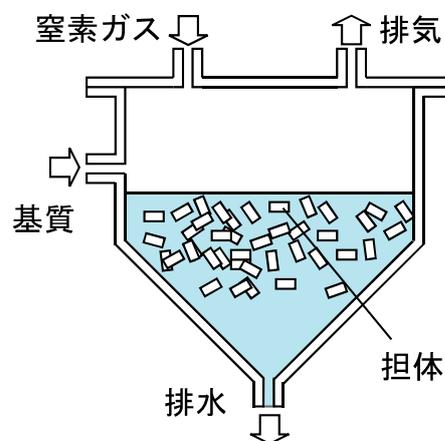


図1 スクリーニング装置

表1 寒天培地添加基質組成

CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COONa	133.4 [mg/L]	( 50 [mg-C/L])
NH <sub>4</sub> Cl	107.0 [mg/L]	( 28 [mg-N/L])
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	36.3 [mg/L]	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	48.0 [mg/L]	( 20 [mg-P/L])
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	90.0 [mg/L]	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14.0 [mg/L]	
KCl	36.0 [mg/L]	
EDTA	3.0 [mg/L]	
微量金属溶液	0.3 [mL/L]	
KNO <sub>3</sub>	101.1 [mg/L]	( 14 [mg-N/L])

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。また、嫌気工程開始時・終了時、および、無酸素工程開始時・終了時にスクリーニング装置内の液相をサンプリングし、リン酸塩・硝酸塩・酢酸塩もしくはプロピオン酸塩濃度を測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 FISH 法を用いた各スクリーニング装置内菌相の比較

スクリーニング装置 S1 に流入する炭素源として酢酸を用いた場合と、プロピオン酸に変更した場合、およびスクリーニング装置 S2 における装置内菌群に対してそれぞれ FISH 法を施した。結果を図 2 に示す。S1 の酢酸による運転時においては *Rhodocyclus* 属は 3 割以上集積できたものの、 $\gamma$ -*Proteobacteria* 網、*Competibacter* も同程度存在した。そこで *Competibacter* を減少させるためプロピオン酸に変更した。S2 のプロピオン酸による運転時は  $\beta$ -*Proteobacteria* 網は増加し、 $\gamma$ -*Proteobacteria* 網は減少した。主要な GAOs である *Competibacter* は  $\gamma$ -*Proteobacteria* 網に属することから  $\gamma$ -*Proteobacteria* 網の減少は相対的に GAOs が減少したと言える。そのことからプロピオン酸が GAOs の駆逐に寄与したと考えられる。そこで S1 装置でもプロピオン酸での運転を試みたが酢酸による運転時とあまり変化が見られなかった。その原因は培養期間の違いが考えられる。S1 装置内の菌量が増えすぎたため菌を新たに担体に付着させてプロピオン酸で培養を行ったが、期間が短かったため PAOs の菌量の割合が増加しなかったということが考えられる。プロピオン酸を用いる利点は *Competibacter* がプロピオン酸を摂取できないため PAOs の増殖速度が相対的に速くなることである。このことからプロピオン酸を炭素源として用い、菌の付着した担体を新しい担体に取り換えながら装置内の菌量を調節してスクリーニング操作を長期間行うことで PAOs の占有率が大きくなることが期待できる。

#### 3.2 寒天培地

寒天培地用基質と混合する活性汚泥上清の割合を 0、20、50、100% としてスクリーニング装置 S1 (プロピオン酸を炭素源として使用) の担体上の菌を植菌し、培養した。定性的ではあるが、2 週間後の菌の増殖状況を表 2 に示す。上清無添加の寒天培地ではコロニーが形成されない短期間において、上清が添加された寒天培地ではコロニーが観察された。寒天培地上で汚泥上清が 50% の系で最も増殖が多く、次いで 20%、100% の順で増殖が見られた。したがって、ある程度栄養がある場合では汚泥上清の割合が大きいほど菌の増殖に効果がある。生育促進化合物の添加による効果があると考えられる。この寒天培地上に増殖した菌が PAOs であるかどうかの検討を別途行う必要があるものの、PAOs の場合は生育速度も遅いことから汚泥上清を用いた分離が有効であると考えられる。

### 4. おわりに

プロピオン酸を用いることで、*Competibacter* を抑制できる可能性が示唆された。しかし、短期的な結果しか得られていないので PAOs の高濃度集積に向け長期的な影響を観測する必要がある。また、活性汚泥上清を用いた培養の効果が見られたため、今後分離作業に応用できる方法を検討していきたい。

#### 【参考文献】

- 1) 肘井史朗 (2006) ; 高度下水処理における脱窒性脱リン細菌の単離の試みと微生物群集構造解析, 九州大学修士論文
- 2) Huabing Lu *et al.* (2006) ; Obtaining highly enriched cultures of Candidatus Accumulibacter phosphates through alternating carbon sources, *Water Research*, 40,20,pp.3838-3848
- 3) 鎌形洋一ら (2005) ; 未知の生育因子を介した微生物間相互作用, 第 8 回日本水環境学会シンポジウム講演集, p.47

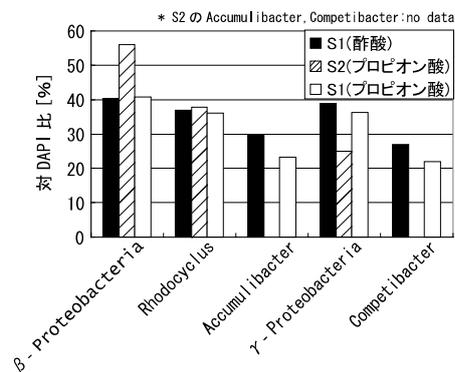


図 2 スクリーニング装置内の各菌の占有率

表 2 寒天培地上の菌の増殖

活性汚泥上清の割合(%)	菌の増殖状況
0	-
20	+
50	++
100	+

-	...	増殖していない
+	...	比較的増殖している
++	...	増殖している