

(6) 嫌気-無酸素連続回分スクリーニング法による
脱窒脱リン菌単離の試み

Isolation of the Denitrifying Phosphate-Accumulating
Organisms Using Alternating Anaerobic-Anoxic Screening Method

浜田康治*、久場隆広**、金山拓広*、楠田哲也**

HAMADA, Koji*, KUBA, Takahiro**, KANAYAMA, Takuhiro*, KUSUDA, Tetsuya**

ABSTRACT; A brandnew screening equipment was proposed to isolate the denitrifying phosphate-accumulating organisms. A screening work was carried out under the alternating anaerobic-anoxic condition. At only anaerobic phase, acetate was used as a sole organic matter. At the anoxic phase, nitrate as a final electron acceptor and no organic matters were added. Since the inside of equipment was washed with distilled water at the shifting phase from each condition to the other condition, acetate and nitrate did not exist simultaneously during the work. As a result of these works using activated sludge in a municipal waste water treatment plant, three kinds of pure cultures of *Stenotrophomonas acidaminiphila* closely related species, *Pseudomonas fulva* closely related species and *Acinetobacter johnsonii* closely related species were obtained. All of isolated bacteria were able to accumulate polyphosphate and PHB, and had the phosphate removal activity under unique conditions such as alternating anaerobic-anoxic conditions. By microscopy with a staining method it is reasonable to suppose qualitatively that these bacteria are responsible for enhanced biological phosphorus removal.

KEYWORDS; Phosphate-accumulating organisms (PAOs), Denitrifying dephosphatation, Isolation, Enhanced biological phosphorus removal (EBPR), Waste water treatment plant (WWTP)

1. はじめに

EBPR(Enhanced Biological Phosphorus Removal)は広く廃水におけるリン除去に適用されている。一般に脱リン菌は体内にポリリン酸及びポリ-β-ヒドロキシ酪酸(PHB)を蓄積可能である。脱リン菌は、嫌気-好気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 として体内に蓄積する。また、好気条件下ではリン酸塩を過剰摂取しながらポリリン酸として体内に蓄積する¹⁾。嫌気-無酸素連続回分条件でも同様の活性を示す脱窒脱リン菌の存在が指摘されている²⁾。脱リン菌と脱窒脱リン菌の活性の大きな違いは無酸素条件下での活性である。無酸素条件下において、有機物が存在すると、脱リン菌・脱窒脱リン菌共に体内に蓄積しているポリリン酸を分解しながら有機物を摂取する。有機物が存在しない無酸素条件下において、脱リン菌は、硝酸塩を最終電子受容体としてエネルギーを獲得できない。よって、体内のポリリン酸を分解しエネルギーを獲得するため、それに伴いリン酸塩を放出する。これに対して、脱窒脱リン菌は、硝酸塩を最終電子受容体として利用可能であるため、体内に蓄積している有機物を代謝することでエネルギーを獲得(脱窒)しながらリン酸塩を摂取する。この反応は脱窒脱リン反応と呼ばれる。この脱窒脱リン反応を利用することにより、EBPR システム内で有機物の有効利用が可能となる。しかし、この脱窒脱リン菌は未だかつて単離された例はなく、その有用性は指摘できてまったく未知である。よって、

* 九州大学 大学院 工学府 都市環境システム工学専攻 (Dept. of Urban and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, KYUSHU UNIVERSITY),

** 九州大学 大学院 工学研究院 環境都市部門 (Dept. of Urban and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, KYUSHU UNIVERSITY)

一刻も早い脱窒脱リン菌の全容解明が求められている。

これまでも、従来の生物学的手法や分子生物学的手法を利用してのリン除去菌特定のための研究が行われている。それらの結果により、現在、リン除去を担う菌であると確定している菌群、あるいは、リン除去菌であろうと推定される菌群は以下の4種類に分別可能である。(1)*Rhodocyclus*属；リン除去菌はグラム陽性で高G+C含量の菌であると示唆されている³⁾。その中でも、分子生物学的手法によりβ-Proteobacteriaに属する菌の中にリン除去を担う菌が存在するであろうとされている。β-Proteobacteriaは、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法を用いた検討により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⁴⁾。現在は、β-Proteobacteriaの中でも、*Rhodocyclus*属が最もリン除去を担う菌群に近いとされている。*Rhodocyclus*属は光合成細菌であるが、EBPRを担っている活性汚泥は光合成による増殖活性があまり認められないため、*Rhodocyclus*属に近縁で光合成活性のみが欠如している菌として、新たに*Candidatus Accumulibacter phosphatis*の存在も指摘されている⁴⁾。(2) *Lampropectia*属；*Lampropectia*属はEBPR活性を有する活性汚泥から単離された菌である⁵⁾。*Lampropectia*属は嫌気条件下において酢酸塩を唯一の炭素源とし、その体内にPHBを蓄積可能であり、その際のリン酸塩放出も同時に確認されている⁶⁾。しかしながら、その形態学的特徴及び嫌気条件下での酢酸塩摂取におけるP/C比が $0.11\text{mg-P}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{C}$ とEBPR汚泥に比べ低いことからEBPRシステム内において占有率が低いとされている。(3)*Microlunatus phosphovorius*(NM-1株)；グラム陽性の球菌である *Microlunatus phosphovorius*は活性汚泥から単離されている⁷⁾。基質中の有機物代謝及びリン酸塩の代謝がEBPR代謝モデルと同様の活性を示すため、EBPRを担う優先的なリン除去菌であると考えられていた。しかし、その後の研究により、この菌はグルコースやアミノ酸の資化能は有しているが、リン除去菌が好んで利用するとされている酢酸塩の資化能を有していないことが示された。さらに、分子生物学的手法により、EBPR活性を有する活性汚泥内での占有率が低いことも示されている⁷⁾。(4)*Acinetobacter*属；γ-Proteobacteriaに属する *Acinetobacter*属も活性汚泥から単離された菌である。*Acinetobacter*属は、絶対好気性菌であるが、酢酸塩やエタノールを利用可能であること、リンを体内に過剰摂取可能であることなどから、リン除去菌であると考えられた最初の菌である⁸⁾。しかし、嫌気条件下においてリン酸塩の放出を伴うPHBの蓄積が確認されていない⁹⁾など、これまで単離された*Acinetobacter*属に属するどの種もリン除去を担うような物質の代謝活性を持っていない。また、分子生物学的手法からEBPR活性汚泥中における *Acinetobacter*属の占有率は10%未満と低いことも示されている³⁾。

生物学的リン除去システムの最適化のためには、リン除去菌の同定、さらにはその生化学的・微生物学的特性の把握は必要不可欠である。しかしながら、EBPRシステムにおいて優占種となるようなリン除去菌の単離には未だ成功していない。従来の単離手法は、EBPR汚泥から平板培養法により純菌を得るものが主流であった。依然として単離が成功していないため、単離手法を見直す必要があると考えられる。本研究の目的は大きく3つである。(1)リン除去菌を分離可能な新たな単離手法を提案する。(2)提案した単離手法により菌を単離する。(3)単離された菌が実際にEBPR代謝モデルに示される活性を有するか否かを実験によって確認する。新たに提案する単離手法は、酢酸塩を唯一の炭素源として嫌気-無酸素連続回分条件によりスクリーニングをかけるため、脱窒脱リン菌のみを選択的に増殖させることが可能である。このような嫌気-無酸素もしくは嫌気-好気連続回分条件によるリン除去菌の単離はもちろん、酢酸塩を唯一の炭素源とした単離も前例がない。

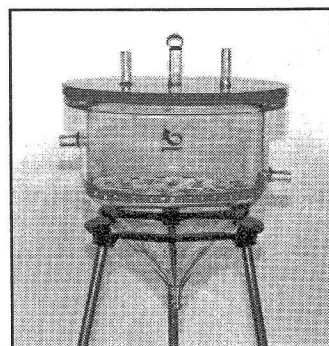


Fig.1 スクリーニング装置

2. 実験方法

2.1 リン除去菌スクリーニング装置

脱窒脱リン菌のスクリーニングを目的とした装置を新たに考案した (Fig.1)。装置の基本構造は内径96mm、高さ50mmの円筒の下部に高さ

50mmの円錐を取り付けた形状となっており、円筒部と円錐部の境界には、水抜き穴を無数に配した中板が設置されている。蓋には純窒素ガス流入口と排気口がある。円錐部の最深部には基質流出口を、円柱部の側壁には基質流入口とオーバーフロー口を設置した。これにより、中板の表面まで基質で満たすことができる。中板の上にはフィルタを設置可能であり、設置したフィルタは基質に浸される。基質を入れ替えることで嫌気および無酸素条件を交互に与えることが可能である。オーバーフロー口外部にはU字管を、排気口にはメンブレンフィルタ(孔径1 μ m)を設置しているため、外部からの雑菌混入を回避可能である。

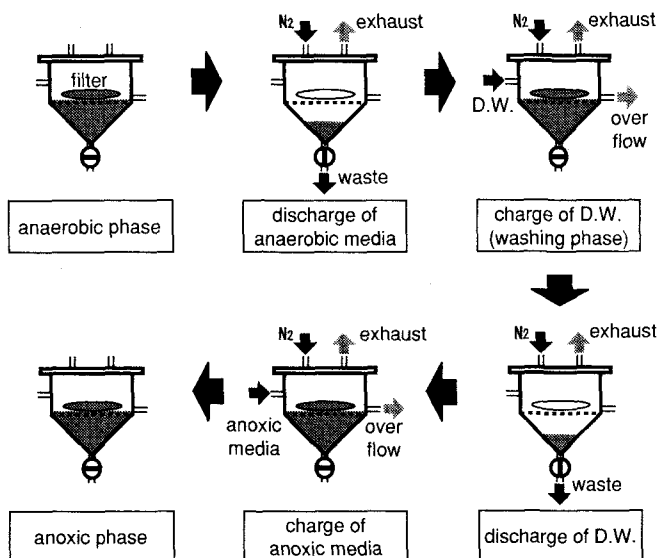


Fig.2 スクリーニング装置による遷移工程

2.2 リン除去菌スクリーニング操作

嫌気-好気法で運転されている都市廃水処理場からリン除去活性を持つ活性汚泥を採取した。超音波分散装置(カイジョー社TYPE4280)を用いて菌を分散させた後(19.5kHz・200W・1分)、その汚泥を吸引濾過により孔径45 μ mの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ヶ月間さらし、フィルタ上にコロニーを生成させた。有機物はリン除去菌が最も好むとされている酢酸塩を使用し(Table 1,2)、嫌気条件下でのみ存在するようにした。スクリーニング中は20 $^{\circ}$ Cを保持した。

Fig.2に嫌気条件から無酸素条件への遷移工程の手順を示した。嫌気工程用の基質を基質流出口より流出させた後、蒸留水を装置内に流入させた。フィルタを蒸留水に数分浸すことによってフィルタ及び装置内部を洗浄した後、蒸留水を流出させた。その後、無酸素条件用の基質(Table 1)を共洗いのために充填した。洗浄工程と同様に、基質に数分間浸した後、基質を流出させた。最後にもう一度、無酸素工程用の基質を充填し、無酸素工程を開始した。遷移工程は20分間である。この間、窒素ガス注入により装置内への酸素の混入を防いだ。使用した基質及び蒸留水は滅菌済みで、各サイクルでの使用前に窒素ガスを用いて数分間にわたり脱気した。無酸素条件から嫌気条件への遷移工程においても同様な手順に従った。

Table 1,2にスクリーニング作業に用いた嫌気工程用基質および無酸素工程用基質の組成を示した。酢酸塩濃度・硝酸塩濃度・リン酸塩濃度以外の基質組成はSmolders *et al.*¹⁰⁾に従った。作成した基質及びスクリーニング装置の洗浄用蒸留水は、オートクレーブにより滅菌処理(120 $^{\circ}$ C・40分)した。また、洗浄工程では蒸留

Table 1 スクリーニング用基質の組成(1)

	Anaerobic	Anoxic
CH ₃ COONa・3H ₂ O	850.0 [mg] (150 [mg-C])	-
KNO ₃	-	202.2 [mg] (28 [mg-N])
KH ₂ PO ₄	36.3 [mg]	(20 [mg-P])
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	143.4 [mg]	
NH ₄ Cl	107.0 [mg]	
MgSO ₄ ・7H ₂ O	90.0 [mg]	
CaCl ₂ ・2H ₂ O	14.0 [mg]	
KCl	36.0 [mg]	
yeast extract	1.0 [mg]	
EDTA	3.0 [mg]	
nutrient solution	0.3 [mL]	

unit: [per liter]

Table 2 基質の組成(2)

nutrient solution	
FeCl ₃ ・6H ₂ O	1.50
H ₃ BO ₃	0.15
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.03
KI	0.03
MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.12
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.06
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.12
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.15

unit: [g/L]

水を使用しているが、嫌気工程及び無酸素工程において使用している基質の物質濃度は低く、基質使用時と蒸留水使用時とで大きな浸透圧の差が生じないと考えられる。よって、蒸留水使用による菌へのダメージは少ないと判断した。

2.3 菌の分離及び塩基配列決定

スクリーニング作業で得られたフィルタ上のコロニーを緩衝液に懸濁させ、LB Broth+ 寒天培地(Becton Dickinson, NJ, USA)に植菌し、30℃で1日間培養することで純粋なコロニーを得た。

Applied Biosystems 社のプロトコル(P/N4308132 Rev.A)に従い、単離菌から DNA を抽出し、16S rDNA 領域5'末端側約 500bp の塩基配列を決定した。MicroSeq Microbial Identification System Software V.1.4.1 により獲得した塩基配列情報と近縁と考えられる種の相同性検索を試みた。相同性検索を行う際のデータベースとして MicroSeq Bacterial 500 Library v.0023(Applied Biosystems, CA, USA)を使用した。さらに、BLASTを用いて GenBank DNA 塩基配列データベースに対して相同性検索を試みた。なお、分離作業および近縁種推定は株式会社エヌシーアイエムビー・ジャパンに委託した。

2.4 ポリリン酸及び PHB 蓄積能確認実験

スクリーニング作業の手法と同様に、単離菌をメンブレンフィルタに固定してスクリーニング装置に投入した。スクリーニング装置投入前の菌とスクリーニング装置投入14日後の菌にそれぞれポリリン酸及びPHB染色を施し、その変化を観察した。

染色法は Staining Procedures に従い、ポリリン酸染色には Gohar¹²⁾による手法を、PHB 染色には Burdon¹³⁾による手法を使用した。染色後は、CCD カメラ(HAMAMATSU 社 C5810-1)が付属した顕微鏡(OLYMPUS 社 BH2-RFCA)を用いてコンピュータ内に染色結果の画像を取り込んだ。画像処理及び画像解析には Adobe 社 Photoshop ver.6 及び nexus 社 NewQube rev.2.1 を使用した。

2.5 嫌気-無酸素条件下における脱窒脱リン活性確認実験

試験管内で酢酸塩を十分に含んだ基質(500mg-C/L)に、前述のスクリーニング装置投入 14 日後の単離菌を懸濁させ、嫌気状態に6時間保った。嫌気工程終了後、遠心分離法により菌を回収した。菌を蒸留水に懸濁させて洗浄した後に遠心分離法により菌を再度回収した。回収した菌を有機物を含まず硝酸塩(7mg-N/L)を含んだ基質に懸濁させ、無酸素状態に12時間保った。実験中は20℃を保持した。実験開始時と嫌気工程終了時、無酸素工程終了時の菌にそれぞれポリリン酸及びPHB染色を施し、その変化を観察した。染色法は2.4節と同様である。

3. 結果

3.1 スクリーニング・分離された菌

都市廃水処理場から採取したEBPR汚泥を用いたスクリーニング・分離作業の結果、単離菌1～3の3種の菌を得た。

単離菌1の16S rDNA 塩基配列は、MicroSeq を用いた解析の結果、*Pseudomonas pictorum* の16S rDNA に対して相同率99.60%となり最も高い相同性を示した。分子系統樹上でも単離菌1の16S rDNA は *P. pictorum* の16S rDNA とクラスターを形成した。BLAST を用いた相同性検索の結果、16S rDNA は相同率100%で *Stenotrophomonas acidaminiphila* ATCC700917 株および AMX19 株の16S rDNA と一致した。

単離菌2の16S rDNA 塩基配列は、MicroSeq を用いた解析の結果、*Pseudomonas fulva* の16S rDNA に対して相同率99.43%となり最も高い相同性を示した。分子系統樹上でも単離菌2の16S rDNA は *P. fulva* の16S rDNA とクラスターを形成した。BLAST を用いた相同性検索の結果、現時点では単離菌2の16S rDNA と完全に一致する配列は検索されなかった。

単離菌3の16S rDNA 塩基配列は、MicroSeq を用いた解析の結果、*Acinetobacter johnsonii* の16S rDNA に対して相同率98.85%となり最も高い相同性を示した。分子系統樹上でも単離菌3の16S rDNA は *A. johnsonii* の16S rDNA とクラスターを形成した。BLAST を用いた相同性検索の結果、現時点では単離菌3の16S rDNA と

完全に一致する配列は検索されなかった。

3.2 染色法によるポリリン酸及びPHB蓄積能確認実験

スクリーニング及びそれに続く分離作業によって得られた3種の菌が、嫌気-無酸素回分条件下においてポリリン酸・PHBを蓄積可能であるか否かを確認した。また、この実験に用いた単離菌は、3菌ともに全て、好氣的に前培養されていた。

Table 3(a),(b),(e),(f)に結果をまとめた。ここで、Table 3に示されている菌体に占めるポリリン酸及びPHBの含有割合の計算法は以下の通りである。コンピュータに取り込んだ染色写真において、ポリリン酸・PHB染色共に顆粒部分が黒く、細胞質部分が淡赤色に染色されており、背景は淡黄色であった。この写真にコントラストを高めるフィルタ処理を施すことにより、画像全体を黒(顆粒)と赤(細胞質)と黄色(背景)に三元化した。この三元化された画像において、それぞれの色が占める面積を求めた。それぞれの顆粒(黒)が菌体(黒+赤)に占める割合(以降、含有率と表記)を百分率で算出し、両顆粒のおおよその含有率として評価した。この作業をそれぞれ9視野に対して施した。更にそれぞれの視野において算出した含有率を正規分布に従うと仮定し、平均値と標準偏差を求めた。

単離菌1は、初期状態においてポリリン酸・PHB共に体内にはほとんど蓄積していなかった(Table 3(a),(e))。しかしながら、14日間にわたり嫌気-無酸素回分条件で培養したことにより、体内にポリリン酸及びPHBを蓄積した(Table 3(b),(f))。Fig.3(a),(b),(e),(f)は特徴的であった単離菌1の写真である。ポリリン酸及びPHB染色の結果は、培養開始時の結果がそれぞれFig.3(a)及び(e)、培養14日後の結果がそれぞれFig.3(b)及び(f)である。黒濃く染色されている箇所がそれぞれポリリン酸顆粒(Fig.3(a),(b))・PHB顆粒(Fig.3(e),(f))であり、薄く染色されている箇所が菌体細胞質である。写真からも、14日後には両顆粒を体内に蓄積するようになった様子が確認できる。

Table 3 ポリリン酸及びPHB染色の結果のまとめ(n=9)

AVE ± STD. DEV. (MIN. - MAX.)	polyphosphate / BIOMASS			
	before the alternating AA incubation (a)	batch exp. (the 14th day of incubation)		
		initial of batch exp. (b)	after anaerobic phase (c)	after anoxic phase (d)
BIOMASS 1 <i>S. acidaminiphila</i> close related	1 ± 1 (0 - 2)	47 ± 8 (35 - 59)	3 ± 1 (1 - 5)	16 ± 5 (10 - 24)
BIOMASS 2 <i>P. fulva</i> close related	6 ± 28 (0 - 27)	29 ± 27 (23 - 32)	16 ± 28 (2 - 44)	15 ± 27 (6 - 30)
BIOMASS 3 <i>A. johnsonii</i> close related	38 ± 14 (13 - 45)	31 ± 8 (22 - 50)	24 ± 9 (15 - 34)	24 ± 7 (10 - 30)
AVE ± STD. DEV. (MIN. - MAX.)	PHB / BIOMASS			
	before the alternating AA incubation (e)	batch exp. (the 14th day of incubation)		
		initial of batch exp. (f)	after anaerobic phase (g)	after anoxic phase (h)
BIOMASS 1 <i>S. acidaminiphila</i> close related	3 ± 2 (0 - 8)	42 ± 3 (37 - 48)	78 ± 3 (72 - 82)	57 ± 6 (49 - 66)
BIOMASS 2 <i>P. fulva</i> close related	23 ± 27 (2 - 55)	53 ± 15 (20 - 71)	81 ± 11 (77 - 83)	69 ± 6 (51 - 78)
BIOMASS 3 <i>A. johnsonii</i> close related	60 ± 7 (45 - 69)	69 ± 4 (58 - 73)	77 ± 5 (74 - 85)	60 ± 4 (52 - 63)

unit: [%], AA: anaerobic-anoxic

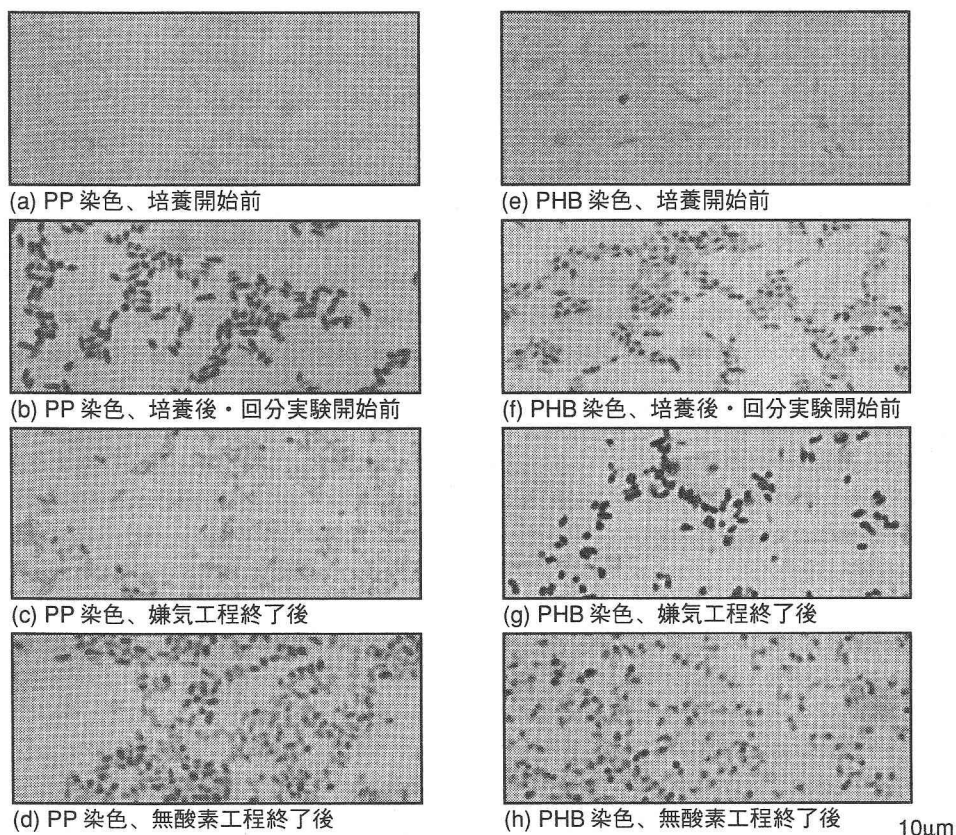


Fig.3 *S. acidaminiphila* 近縁種に対するポリリン酸(a～d)・PHB 染色(e～h)の結果

単離菌2は、初期状態においてポリリン酸は体内にはほとんど蓄積していなかったが、PHBは蓄積していた(Table 3(a),(e))。14日間にわたり嫌気-無酸素回分条件下で培養したことにより、体内にポリリン酸を蓄積した(Table 3(b))。Fig.4(a),(b),(e),(f)は特徴的であった単離菌2の写真である。ポリリン酸及びPHB染色の結果は、培養開始時の結果がそれぞれFig.4(a)及び(e)、培養14日後の結果がそれぞれFig.4(b)及び(f)である。写真からも、14日後には両顆粒を体内に蓄積するようになった様子が確認できる。

単離菌3は、初期状態においてポリリン酸・PHB共にすでに体内蓄積していた(Table 3(a),(e))。培養を14日経ても、両顆粒の含有割合は大きく変化しなかった(Table 3(b),(f))。

3.3 嫌気-無酸素条件下における脱窒脱リン活性確認実験

3.2節の実験結果から、3種の菌全てにポリリン酸及びPHB蓄積能があることが明らかとなったため、それぞれの菌が嫌気-無酸素条件下においてEBPR代謝モデル同様のポリリン酸代謝活性を有するか否かを確認した。Table 3(b)～(d),(f)～(h)に結果をまとめた。表内の数値は前述(3.2節)の手法にて算出したものである。

単離菌1は、初期状態から嫌気工程を経ることでポリリン酸含有率が減少し(Table 3(b),(c))、PHB含有率が上昇した(Table 3(f),(g))。その後の無酸素工程では、ポリリン酸含有率が上昇し(Table 3(c),(d))、PHB含有率が減少した(Table 3(g),(h))。Fig.3(b)～(d),(f)～(h)は特徴的であった単離菌1の写真である。ポリリン酸及びPHB染色の結果は、実験開始時の結果がそれぞれFig.3(b)及び(f)、嫌気工程終了後の結果がそれぞれFig.3(c)及び(g)、無酸素工程終了後の結果がそれぞれFig.3(d)及び(h)である。黒濃く染色されている箇所がそれぞれポリリン酸顆粒(Fig.3(b)～(d))・PHB顆粒(Fig.3(f)～(h))であり、薄く染色されている箇所が菌体細胞質である。写真からも、初期状態から嫌気工程を経ることでポリリン酸含有率が減少し、PHB含有率が上昇したことが確認でき

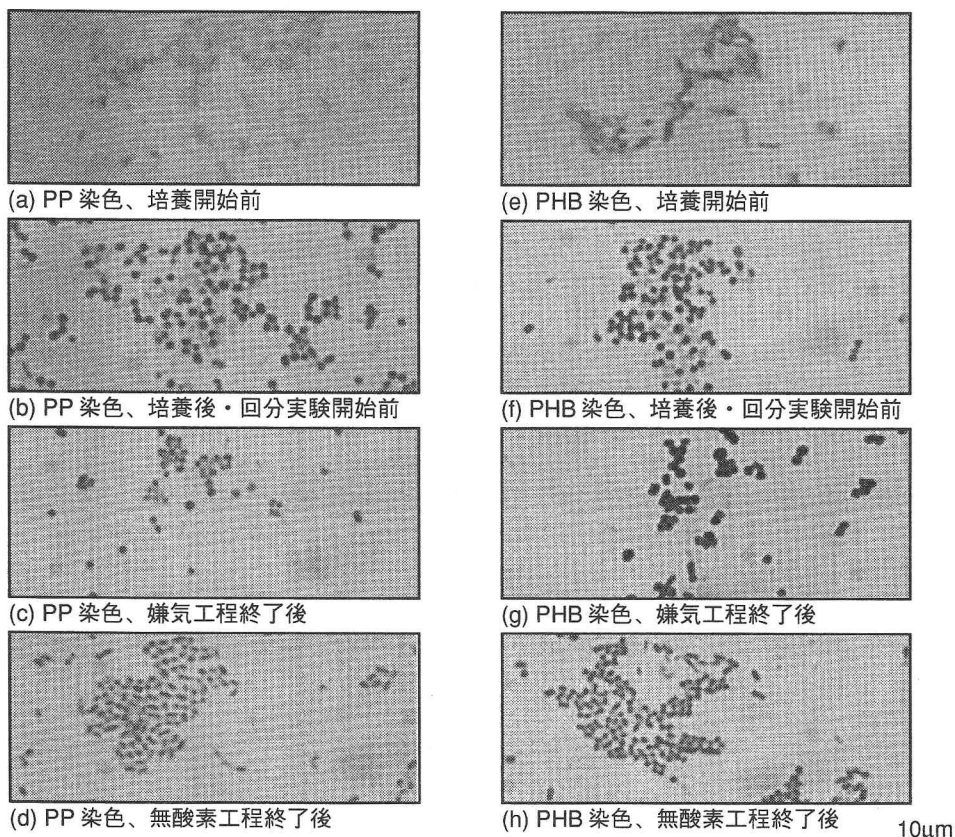


Fig.4 *P. fulva* 近縁種に対するポリリン酸(a～d)・PHB 染色(e～h)の結果

る。その後の無酸素工程においては、ポリリン酸含有率が増加し、PHB 含有率は減少した。

単離菌2は、初期状態から嫌気工程を経ることでポリリン酸含有率が減少し(Table 3(b),(c))、PHB 含有率が上昇した(Table 3(f),(g))。その後の無酸素工程では、PHB 含有率は減少したが(Table 3(g),(h))、ポリリン酸含有率は変動しなかった(Table 3(c),(d))。Fig.4(b)～(d),(f)～(h)は特徴的であった単離菌2の写真である。ポリリン酸及びPHB染色の結果は、実験開始時の結果がそれぞれFig.4(b)及び(f)、嫌気工程終了後の結果がそれぞれFig.4(c)及び(g)、無酸素工程終了後の結果がそれぞれFig.4(d)及び(h)である。写真からも、初期状態から嫌気工程を経ることでポリリン酸含有率が減少し、PHB 含有率が上昇したことが確認できる。その後の無酸素工程においては、ポリリン酸の明確な増加は確認されなかったが、PHB は明確に減少していた。

単離菌3は、嫌気工程、無酸素工程を通じてポリリン酸の有意な変動は確認することができなかった(Table 3(b)～(d))。しかしながら、上述の単離菌2の無酸素工程での代謝同様に、染色写真では視野によってはそれぞれの物質がEBPRモデルに従い代謝されていると判断することも可能な結果も得られている。PHBの代謝はEBPRモデル同様の挙動を示すことを確認できた(Table 3(f)～(h))。

4. 考察

4.1 分子生物学的手法による単離菌の同定

都市廃水処理場から採取したEBPR汚泥を用いたスクリーニング作業・分離作業の結果、3種の菌を得た。3種の菌それぞれに対しBLAST解析の結果、近縁種が特定された。しかしながら、相同性検索の結果相同率100%であったとしても、16S rRNA解析のみで菌種を特定することは困難である。従って、現段階では単

離菌はそれぞれ、*Stenotrophomonas acidaminiphila* 近縁種、*Pseudomonas fulva* 近縁種、*Acinetobacter johnsonii* 近縁種とした。*S. acidaminiphila* は UASB から単離されたという報告があり、PHB を嫌氣的に体内に蓄積可能である¹³⁾。*Pseudomonas* 属・*Acinetobacter* 属は、体内に Poly-P を蓄積する菌であることが広く知られている。特に *Acinetobacter* 属は最初にリン除去菌であると指摘された菌でもある。しかしながら、これまでの研究においては、生物学的リン除去を担うような活性をもつ種はそれらの属の中からは同定されていない。よって、最近の研究では、*Pseudomonas*・*Acinetobacter* 両属共にリン除去菌ではないとの見方が強くなっている。また、本研究において得られた単離菌はすべて γ -Proteobacteria に属する菌であった。これまでの研究で EBPR 汚泥の 80～90% が β -Proteobacteria に属する菌群との報告もある^{4),14)}。従って、従来の分子生物学的アプローチでは、本研究において得られた様な γ -Proteobacteria に属する菌は EBPR システム内での優占種である可能性が低いとされてきた。

本研究において、これらの菌群に近縁な種が単離菌として得られていることは、非常に興味深い結果である。ここで、これらの菌がリン除去菌であるか否かをスクリーニング手法から考察すると、本研究で採用したスクリーニング手法では、前述のように、有機物は厳密に嫌気工程にしか存在しない。嫌気工程から無酸素工程への遷移工程において蒸留水を用いた洗浄工程、並びに基質による共洗い工程を経るため、無酸素工程では有機物は存在しないと考えられる。付け加えて、本実験において使用している有機物は、リン除去菌が優先的に使用されると言われる酢酸塩である。すなわち、このような厳密な条件下で生存可能な菌は、リン除去活性を有する菌以外には考えにくく、本研究において得られた単離菌は優占種ではないとしても生物学的リン除去活性を有する菌である可能性が高い。

4.2 単離菌に対する脱窒脱リン活性の確認

スクリーニング及びそれに続く分離作業によって得られた3種の菌が、嫌気-無酸素回分条件下においてポリリン酸及びPHBを蓄積可能か否か、また、嫌気-無酸素回分条件下においてEBPRを担うポリリン酸及びPHB代謝活性を有するか否かを確認した(Table 3、Fig.3, 4)。14日間に渡り嫌気-無酸素回分条件下で培養した結果、3種の菌共にポリリン酸及びPHBを蓄積した。前述の通り、実験は厳密な嫌気-無酸素条件となっており、電子受容体と有機物が同時に存在することはない。酸素の混入もない。更に、本研究における培養及び回分実験はすべて暗条件下で実施されており、光合成によりエネルギーを獲得する菌の増殖は不可能である。つまり嫌気条件下において酢酸塩を摂取・利用可能な従属栄養細菌のみが生存可能である。この嫌気条件下での酢酸塩摂取という特殊な反応は、メタン生成菌が絶対嫌気性菌であることを考慮すると、リン除去菌のような特殊な菌以外の菌は達成しえないと考えられる。更に、この嫌気-無酸素回分条件下においてポリリン酸も蓄積可能であったことから、これら3種の菌が脱窒脱リン活性を有する菌であると示唆された。

脱窒脱リン菌は嫌気-無酸素回分条件下において、嫌気工程でポリリン酸含有率が減少し、PHB含有率が増加するはずである¹⁵⁾。また、その後の無酸素工程においてポリリン酸含有率が増加し、PHB含有率が減少する。培養14日後に実施した嫌気-無酸素回分実験による顕微鏡写真からは、3種の単離菌全てがEBPRを担うポリリン酸及びPHB代謝活性を有していると解釈可能であった(*S. acidaminiphila* は Fig.3、*P. fulva* 近縁種は Fig.4 参照)。しかし、ポリリン酸及びPHB含有率(Table 3)では、*S. acidaminiphila* 近縁種は、ポリリン酸代謝・PHB代謝ともに確認できるものの、*A. johnsonii* 近縁種はPHB代謝を、*P. fulva* 近縁種はポリリン酸代謝を確認できなかった。これは、この画像解析手法に関する検討はまだ十分ではなく、算出された値も顕微鏡視野によって大幅に変化しており、かなり大きな誤差を含有しているためと考えられる。更に、顕微鏡写真という2次元画像を使用していることも影響していると考えられる。染色法による定性的検討結果のみより、脱窒脱リン活性の有無を結論づけることは困難であるが、スクリーニング手法・回分実験の結果を総合的に考慮すると、これらの単離菌が脱窒脱リン活性を有する菌であると推定された。

5. 結論

新しく提案したスクリーニング手法により、*Stenotrophomonas acidaminiphila* 近縁種・*Pseudomonas fulva* 近縁

種・*Acinetobacter johnsonii* 近縁種の3種の純菌が得られた。電子受容体(硝酸塩)と有機物(酢酸塩)が同時に存在することのない厳密な嫌気-無酸素条件の下で、それらの単離菌を14日間にわたり培養した結果、3種の菌全てがポリリン酸及びPHBを蓄積した。スクリーニング装置の特性及び培養14日後に実施した回分実験の結果より総合的に判断すると、本研究において得られた単離菌はEBPR汚泥内での優占種ではないとしても脱窒脱リン活性を有する菌であると示唆された。

現時点では、染色法を用いた定性的な議論のみに終わっている。今後は、これらの単離菌に対する定量的な議論のための更なる検討が必要である。

参考文献

- 1) Mino T., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Wat. Res.* **32**(11): 3193-3207.
- 2) Kuba T., Smolders G.J.F., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. (1993) Biological phosphorus removal from waste water by anaerobic anoxic sequencing batch reactor. *Wat. Sci. Tech.* **27**(5-6): 241-252.
- 3) Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D. and Schleifer K.H. (1994) Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 762-800.
- 4) Hesselmann R.P.X., Werlen C., Hahn D., van der Meer J.R. and Zehnder A.J.B. (1999) Enrichment, phylogenetic analysis and detection of bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 454-465.
- 5) Stante L., Cellamere C.M., Malaspina F., Bortone G. and Tilche A. (1997) Biological phosphorus removal by pure culture of *Lamprospira* spp. *Wat. Res.* **31**: 1317-1324.
- 6) Nakamura K., Hiraishi A., Yoshimi Y., Kawaharasaki M., Masuda K. and Kamagata Y. (1995) *Micrococcus phosphorus* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 17-22.
- 7) Kawaharasaki M., Tanaka H., Kawanaga T. and Nakamura K. (1999) *in situ* identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. *Wat. Res.* **33**(1): 257-265.
- 8) Fuhs G.W. and Chen M. (1975) Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microb. Ecol.* **2**: 119-138.
- 9) Tandoi V., Majone M., May J. and Ramadori R. (1998) The Behaviour of Polyphosphate Accumulating *Acinetobacter* Isolates in an Anaerobic-Aerobic Chemostat. *Wat. Res.* **32**(10): 2903-2912.
- 10) Smolders G.J.F., van der Meij J., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (1994) Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 837-848.
- 11) Gohar M.A. (1944) A staining method for *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **47**: 575.
- 12) Burdon C.R. (1946) Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *J. Bacteriol.*, **52**: 665.
- 13) Assih E.A., Ouattara A.S., Therry S., Cayol J.L., Labat M. and Macarie H. (2002) *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 559-568.
- 14) Crocetti G.R., Hugenholtz P., Bond P.L., Schuler A., Keller J., Jenkins D. and Blackall L.L. (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(3): 1175-1182.
- 15) Kuba T., Murnleister A., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. (1996) A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **52**: 685-695.