

(25) 活性汚泥による 酢酸摂取へのPHA蓄積細菌の寄与

押木 守^{1*}・小貫 元治²・佐藤 弘泰¹・味埜 俊¹

¹ 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系 (〒277-8561千葉県柏市柏の葉5-1-5)

² 東京大学サステイナビリティ学連携研究機構 (〒113-8656東京都文京区本郷7-3-1)

* E-mail: oshiki@mw.k.u-tokyo.ac.jp

実下水処理場の活性汚泥を用いたバッチ試験を異なる電子受容体存在下で実施し、活性汚泥による酢酸摂取へPHA蓄積細菌が寄与した割合を評価した。その際にNile blue Aで検出される細菌をPHA蓄積細菌とみなし、存在割合をNile blue AとDAPIの二重染色法により定量評価した。酢酸摂取にNile blue A陽性細菌が寄与した割合は2~10割であり、好気条件で培養した活性汚泥でNile blue A陽性細菌は全菌の1~2割を占めた。さらにFISH法により*Candidatus "Accumulibacter phosphatis"*と*Candidatus "Competibacter phosphatis"*の存在割合を定量評価し、これらの細菌がNile blue A陽性細菌の中で1~9割を占めることを明らかにした。

Key Words : 電子受容体, 活性汚泥, 酢酸摂取, PHA蓄積細菌

1. 研究背景

ある種の微生物は摂取した有機物を中間代謝物として貯蔵する能力があることが知られている。そのような中間代謝物の代表例としてPHA (polyhydroxyalkanoate)が知られている¹⁾。PHAは様々な種類の有機物から合成され^{2, 3)}、合成されたPHAは増殖の際に炭素源として用いられ、エネルギープールとして用いられる¹⁾。

活性汚泥が広くPHA蓄積能を有する事がTakabatakeら⁴⁾によって報告されており、PHAの代謝が活性汚泥における易分解性有機物の代謝に大きく影響を及ぼすことが報告されている。Beunら⁵⁾の報告では、SBR内の活性汚泥によって摂取された酢酸の約66%から100%がPHA合成に利用されたことを確認しており、PHAの代謝が有機物摂取に大きく影響を及ぼすことを報告している。このように活性汚泥プロセスにおいてPHAの代謝が及ぼす影響の重要性が明らかにされたことを受けて、活性汚泥を数学モデルで表現する活性汚泥モデルNo3 (以降、ASM3) において易分解性有機物を用いた中間代謝物の代謝プロセスが導入された⁶⁾。中間代謝物としては主にPHAが想定されており、ASM3では従属栄養細菌 (X_H) の増殖はすべて合成された貯蔵物質 (S_S) に依存すると仮定している。しかし、実際には活性汚泥中の一部の細菌のみがPHA蓄積能を有しており、その他の従属栄養細菌は摂取した有機物を直

接増殖に用いている。そのため、ASM3を計算するに当たり、PHA蓄積細菌とその他の従属栄養細菌の割合を把握することが望ましい。しかし、活性汚泥中のPHA蓄積細菌の存在割合を定量評価した報告は乏しい。

これまでに活性汚泥におけるPHAの代謝は、生物学的リン除去を行う嫌気好気法を中心として研究されてきた。それらの研究から、これまでにPHA蓄積細菌として*Candidatus "Accumulibacter phosphatis"*⁷⁾および*Candidatus "Competibacter phosphatis"*⁸⁾が同定されている。これらの細菌は嫌気条件下で酢酸などの低級脂肪酸を好んで摂取し、蓄積したPHAを利用した増殖により、嫌気好気法の活性汚泥中で優占することが知られている⁹⁾。活性汚泥においてこれらの細菌が優占するためには基質となる酢酸を多く摂取する必要があり、ひいては酢酸摂取に強く寄与する必要がある。そして、これらの細菌がPHA蓄積細菌群集に占める割合を評価することは、これらの細菌が酢酸摂取に寄与した割合を評価することにつながると考えられる。

本研究では実下水処理場から採取した活性汚泥を用いて、酢酸を炭素源とした2時間のバッチ試験を行なった。バッチ試験の結果から活性汚泥のPHA含有率、PHA蓄積速度およびPHA転換率を評価した。そして、PHA染色剤であるNile blue Aと核酸染色剤であるDAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) を用いた二重染色法を活性汚泥試料に適用

し、Nile blue A陽性細菌がDAPI陽性細菌に占める存在割合を評価した。また、バッチ試験において電子受容体の異なる条件(酸素(好気)、硝酸、亜硝酸、電子受容体無し(嫌気))を設定し、電子受容体の違いが及ぼす影響を評価した。続いて、バッチ試験で得られた結果からNile blue A陽性細菌が酢酸摂取にどの程度寄与していたのかを推定した。さらに、*Candidatus "Accumulibacter phosphatis"*および*Candidatus "Competibacter phosphatis"*の存在割合をFISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いて評価した。プローブ陽性細菌がPHAを蓄積していることを確認した後に、Nile blue A陽性細菌群集にこれらの細菌が占める存在割合を評価した。

2. 実験方法

活性汚泥試料は、2005年の8-11月にかけて東京都内で稼働するM処理場(嫌気/好気法(AO法)、嫌気/無酸素/好気法(A2O法)、標準活性汚泥法(CAS法))、N処理場(AO法、A2O法、CAS法)、K処理場(AO法)の好気槽末端部より採取した。全ての下水処理場では生活下水を主に処理しており、N処理場は分流式で下水が流入し、MおよびK処理場では合流式で下水が流入する。M処理場A2O法より活性汚泥試料を採取した際には降雨後の影響のため放流水中のリン濃度が0.5mg-P/Lであったが、それ以外の活性汚泥試料を採取した際には放流水中のリン濃度は0.1mg-P/L以下であり、良好に運転されていた。

活性汚泥試料を1-3時間以内に実験室に持ち帰り、好気条件で2時間のバッチ試験を行った。さらにM処理場の活性汚泥では好気条件の他に硝酸条件、亜硝酸条件、嫌気条件下でもバッチ試験を行った。なお、本論文では各条件の定義は以下の通りである。好気条件ではエアレーションによる曝気を常に行ない、溶存酸素濃度7.5mg/L以上を保った。硝酸条件、亜硝酸条件では電子受容体としてそれぞれ硝酸、亜硝酸のみを初期濃度約2.5mg-N/Lで添加し、窒素ガスによる曝気を行った。嫌気条件では電子受容体は添加せずに、窒素ガスによる曝気のみを行った。なお、硝酸条件、亜硝酸条件、嫌気条件ではバッチ試験を通して溶存酸素濃度0.1mg/L以下を保った。バッチ試験は1Lのガラス容器内で行い、以下の培地を用いて行った：CaCl₂(2H₂O) 44mg/L、MgCl₂(6H₂O) 453.5mg/L、KCl 210mg/L、NH₄Cl 88mg/L、(NH₄)₂SO₄ 108mg/L、K₂HPO₄ 90mg/L、KH₂PO₄ 70mg/L。まず、持ち帰った活性汚泥を培地で3度洗浄し、MLSSが1g/L以下となるように懸濁させた。バッチ試験では初期酢酸濃度を20mg-C/Lとし、枯渇しないように1時間ごとに酢酸を添加した。亜硝酸条件、硝酸条件では、亜硝酸や硝酸が枯渇しないように1時間ごとに再添加した。なお、硝酸、亜硝酸、嫌気条件では窒素ガスの曝気によって溶存酸素濃度が

0.1mg/L以下になったことを確認した後にバッチ試験を開始した。バッチ試験中のpHは1N H₂SO₄あるいは1N NaOHで調整し、pH 7.8-8.3を維持させた。バッチ試験は実験室で行い、温度制御は行わなかった。バッチ試験中の試料採取はバッチ試験開始時、1時間後、2時間後(バッチ試験終了時)に行った。

酢酸、硝酸、亜硝酸濃度は761 Compact IC (Metrohm, Switzerland) を用いて測定し、カラムにはPacked column for HPLC (Shodex, Japan) を用いた。MLSS、MLVSSはStandard Method¹⁰⁾に従い、測定した。PHAの定量では、まず試料を凍結乾燥し、クロロホルム、硫酸およびメタノールの混合液を用いて試料中のPHAをメチル化した。そして、定量にはガスクロマトグラフィーを用いた¹¹⁾。ガスクロマトグラフィーにはGC14A/FID (Shimadzu, Japan) を用いて、カラムにはNeutrabond-1 (GL Science, Japan, 30m length, 250mm internal diameter, 0.4mm film thickness) を用いた。DetectorとInjectorの温度はそれぞれ250℃、180℃に設定し、カラムの初期温度は60℃にした。昇温プログラムは12℃/minとし、220℃まで6分で上昇させた。試料はShimadzu autoinjector AOC-14AあるいはマニュアルでGCカラムに注入し、スプリット比は1:40とした。活性汚泥中で見いだされるPHAの構成モノマーとしては3HB、3HV、3H2MBおよび3H3MVなどが知られており、酢酸を炭素源とした場合には3HBを主成分とするPHAが合成されることが知られている¹²⁾。そこで、定量では、Sodium 3-hydroxybutyrate (Sigma, USA) を3HBの標準物質として用いた。そして、ICI Japan Inc. より分譲いただいた3HBと3HVのコポリマー(組成比81:19 (wt%)) を3HVの標準物質として用いた。

Nile blue AとDAPIの二重染色では、まずバッチ試験後の活性汚泥を3%パラホルムアミドで固定し、10Wで4分程度の超音波分散処理を行った。分散処理後の試料をゼラチンコーティングしたスライドガラスに塗布した。その後、50%、80%、100%エタノールで順次脱水処理を行った。Nile blue A染色はBeerら¹³⁾に従って行い、染色後に8% acetic acid (v/v) およびMilli-Qでそれぞれ1分間の洗浄を行った。Nile blue A染色後に2μg/mLのDAPIで5分間染色した。顕微鏡観察にはOlympus BX-51あるいはOlympus BX-60 (Olympus, Japan) を用い、CCDカメラにはそれぞれDP-70、DP-50 (Olympus, Japan) を用いた。対物レンズにはU Plan Apo (100倍、開口数1.35, Olympus, Japan) を用いた。Nile blue AおよびDAPIはそれぞれWIG、WUフィルター (Olympus, Japan) で観察した。Nile blue A陽性細菌をPHAを蓄積している細菌、DAPI染色陽性細菌を全菌とし、陽性細菌数を定量するためにダイレクトセルカウントを行い、10視野で計1000細胞以上を計数した。Nile blue Aが陽性であるにも関わらず、Nile blue A陽性細胞からDAPIのシグナルが観察されない問題が報告されており¹⁴⁾、全菌に占めるPHA蓄積細菌の

割合はHanadaら¹⁴⁾と同様に[Nile blue A陽性細菌/(Nile blue A陽性細菌+DAPI陽性細菌)]で計算した。

*Candidatus "Accumulibacter phosphatis"*および*Candidatus "Competibacter phosphatis"*の存在割合を定量評価するためにFISH法を適用した。バッチ試験前の活性汚泥試料を3%パラホルムアルデヒドで固定し、Amann¹⁵⁾に従ってFISH法を行った。使用したオリゴヌクレオチドプローブはPAO462¹⁶⁾ (5'-CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC-3'), PAO651¹⁶⁾ (5'-CCCTCTGCCAAACTCCAG-3'), PAO846¹⁶⁾ (5'-CCCTCTGCCAAACTCCAG-3'), GB¹⁷⁾ (5'-CGATCCTCTAGCCCACT-3')であり、5'末端をCy3標識したものを利用した。なお、PAO462, PAO651, PAO846は混合して用いた。ハイブリダイゼーション時のホルムアミド濃度は35%とした。ハイブリダイゼーションを終えた後にDAPI染色[2μg/mL]を行った。顕微鏡観察時のマウント剤としてSlow Fade-Light Antifade kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA)を用いた。同一視野内のDAPI陽性細菌とプローブ陽性細菌をダイレクトセルカウントし、プローブ陽性細菌がDAPI陽性細菌に占める割合を評価した。

また、*Candidatus "Accumulibacter phosphatis"*および*Candidatus "Competibacter phosphatis"*がPHAを蓄積していることを確認するために、FISH法およびNile blue Aによる逐次染色を適用した。好気、硝酸、亜硝酸条件下でバッチ試験を行った後のM処理場AO法の活性汚泥試料に対してFISH法を適用し、100個程度のプローブ陽性細菌を観察した。観察後にカバーガラスを外し、Nile blue A染色を行った。再び同一の視野を観察し、プローブ陽性細菌の何割がNile blue A染色で検出されるかを評価した。

3. 実験結果

2時間のバッチ試験における酢酸摂取速度、PHA蓄積速度、硝酸および亜硝酸条件下での脱窒速度、PHA含有率およびPHA転換率を測定した結果を表-1に示す。好気条件下でバッチ試験を行った際の酢酸摂取速度は14.2-40.9mg-C-g-MLVSS⁻¹・h⁻¹であった。硝酸条件、亜硝酸条件下での脱窒速度はM処理場の活性汚泥試料でそれぞれ5.6-6.4mg-N-g-MLVSS⁻¹・h⁻¹および5.3-6.2mg-N-g-MLVSS⁻¹・h⁻¹であった。また、2時間のバッチ試験期間において増加したMLSSおよびMLVSSは、バッチ試験開始時のMLSSおよびMLVSSの5%以下であった。

活性汚泥のPHA蓄積速度、PHA含有率、PHA転換率はそれぞれ2.4-21.2mg-C_{PHA}-g-MLVSS⁻¹・h⁻¹、検出下限以下~3.9%、23~104%であった。なお、バッチ試験前の活性汚泥からPHAに由来するピークは検出されなかったが、酢酸を炭素源としたバッチ試験後にPHAの3HBモノマーに由来するピークが検出された。3HVモノマーに由来するピークはいずれの試料からも検出されなかった。また、本研究で用いたPHA定量法の検出下限はPHA含有率0.1%であった。

電子受容体の違いに注目すると、M処理場の活性汚泥では酢酸摂取速度、PHA蓄積速度、PHA含有率は好気、硝酸、亜硝酸、嫌気条件の順に減少し、PHA転換率は逆に増加した。運転法の違いに注目すると、N処理場AO、A2O、CAS法の活性汚泥のPHA含有率はそれぞれ1.4%、1.5%、1.6%であり、M処理場AO、A2O、CAS法の好気条件下ではそれぞれ3.9%、2.5%、3.7%であった。

表-1 バッチ試験から得られた結果から評価した活性汚泥の酢酸摂取速度、PHA蓄積速度、脱窒速度、PHA含有率、およびPHA転換率

処理場	運転法	電子受容体	酢酸摂取速度	PHA蓄積速度	脱窒速度	PHA含有率	PHA転換率
			mg-C・g-MLVSS ⁻¹ ・h ⁻¹	mg-C・g-MLVSS ⁻¹ ・h ⁻¹	mg-N・g-MLVSS ⁻¹ ・h ⁻¹	mg-C _{PHA} ・mg-MLSS ⁻¹ ・100	mg-C _{PHA} ・mg-C _{acetate} ⁻¹ ・100
M	嫌気/好気法 (AO法)	O ₂ (air)	37.6	19.4		3.9%	58%
		NO ₃	15.4	9.6	6.4	1.9%	54%
		NO ₂	10.1	5.0	5.6	1.0%	74%
		Anaerobic	7.9	3.7		0.7%	53%
	嫌気/無酸素/好気法 (A2O法)	O ₂ (air)	14.9	14.1		2.5%	62%
		NO ₃	8.1	5.5	6.0	1.4%	82%
		NO ₂	6.4	7.6	5.3	1.0%	104%
		Anaerobic	ND*	-		<0.1%	-
	標準活性汚泥法 (CAS法)	O ₂ (air)	26.6	21.2		3.7%	52%
		NO ₃	9.4	5.2	5.6	1.2%	64%
		NO ₂	8.1	7.2	6.2	0.9%	73%
		Anaerobic	ND*	2.4		0.4%	-
N	嫌気/好気法 (AO法)	O ₂ (air)	40.9	9.0		1.4%	23%
	嫌気/無酸素/好気法 (A2O法)	O ₂ (air)	34.6	9.0		1.5%	27%
	標準活性汚泥法 (CAS法)	O ₂ (air)	40.5	10.0		1.6%	26%
K	嫌気/好気法 (AO法)	O ₂ (air)	14.2	9.7		1.8%	70%

*酢酸摂取量を評価できなかったものを示す。

Nile blue AとDAPIの二重染色を適用した活性汚泥の顕微鏡観察画像を図-1に示した。Nile blue A陽性細菌の存在割合を定量した結果を表-2に示した。好気条件では、Nile blue A陽性細菌の存在割合は10~17% ($\pm 1\sim 5\%$)であった。M処理場の活性汚泥試料においてNile blue A陽性細菌の存在割合は好気条件で11~16%、硝酸条件で10~14%、亜硝酸条件で6~8%、嫌気条件で2~6%であった。また、M処理場A2O法の嫌気条件の試料ではPHA含有率が検出下限以下であるにも関わらず、Nile blue A陽性細菌が2% ($\pm 1\%$)の存在割合で検出された。なお、いずれの試料についても、バッチ試験前の活性汚泥中にはNile blue A陽性細菌はほぼ見られなかった。

Candidatus "Accumulibacter phosphatis" および *Candidatus "Competibacter phosphatis"* の存在割合をFISH法により定量評価した結果を表-2に示す。*Candidatus "Accumulibacter phosphatis"* および *Candidatus "Competibacter phosphatis"* は全ての活性汚泥試料から共通して検出され、全菌に対してそれぞれ1~3%、~1%の存在割合で検出された。また、N処理場AO法およびA2O法、K処理場AO法の試料を用いて、好気条件でバッチ試験を行なう前後での *Candidatus "Accumulibacter phosphatis"* および *Candidatus "Competibacter phosphatis"* の存在割合の変化をFISH法を用いて解析した結果、バッチ試験の前後で *Candidatus "Accumulibacter phosphatis"* および *Candidatus "Competibacter phosphatis"* の存在割合に有意な変化はなかった。

好気条件、硝酸条件または亜硝酸条件下で酢酸を添加して2時間培養した後の *Candidatus "Accumulibacter phosphatis"* および *Candidatus "Competibacter phosphatis"* のPHAの蓄積をFISH法およびNile blue Aによる逐次染色で確認した。その結果、プローブ陽性細菌の7~9割 ($\pm 1\sim 3$ 割) がPHAを蓄積していた。なお、嫌気条件下で培養した試料に対して同様の実験は行わなかった。

4. 考察

(1) Nile blue A陽性細菌の存在割合の定量結果の精度

本研究ではNile blue A陽性細菌をバッチ試験においてPHAを蓄積した細菌と見なし、全菌中にNile blue A陽性細菌が占める割合をNile blue A染色およびDAPIの二重染色法により評価した。なお、酢酸を添加した2時間のバッチ試験では、試験開始から終了時までのMLSSおよびMLVSSの増加は5%以下であったことから、バッチ試験期間における細菌の増殖が定量値に及ぼす影響は小さいと考えられ、定量評価において細菌の増殖は考慮しなかった。しかし、定量を行う際にNile blue Aの蛍光を観察する方法に問題点があった。Nile blue Aの蛍光強度はPHA含有率

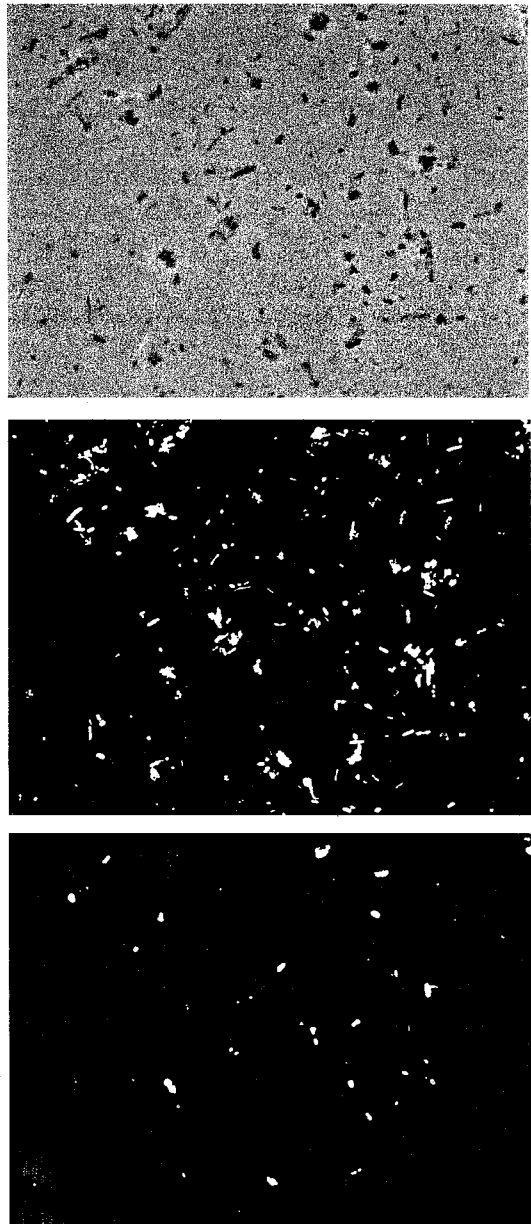


図-1 バッチ試験後の活性汚泥試料に Nile blue A と DAPI の二重染色法を適用した後の顕微鏡観察写真(上段:位相差画像,中段:DAPI 蛍光観察画像,下段:Nile blue A 蛍光観察画像)画像は全て同一視野であり,中段と下段の写真で白い点として観察されている細胞は実際にはそれぞれ青,赤色で観察されている。

が低くなるほど弱くなり、PHAを蓄積しているNile blue A陽性細胞とPHAを蓄積していない擬陽性細胞を区別する事が困難となった。PHA含有率の低い活性汚泥試料ではNile blue A陽性細菌の存在割合を評価した際に、擬陽性の細胞が計数された恐れがある。顕微鏡観察においてNile blue A陽性細菌と擬陽性細菌を区別する観察条件の閾値は観察者の主観に大きく依存する。しかし、観察する試料間で露光時間を揃える (Olympus BX-60を用い、U-ND6-2フィルターを挿入した場合には露光時間を約1/7秒に設定) などの操作により、本手法で活性汚泥中のNile blue A陽性細菌の存在割合をおおまかに把握することが可能であった。

(2) 電子受容体の違いがPHA蓄積およびNile blue A陽性細菌の存在割合に及ぼす影響

これまでに電子受容体の違いがPHA蓄積およびNile blue A陽性細菌の存在割合に及ぼす影響を評価した研究報告は少なく、特に好気条件以外でのNile blue A陽性細菌の存在割合を定量評価した報告はこれまでにないであった。

本研究では嫌気、亜硝酸、硝酸、好気の全ての条件においてPHA合成が行われたことが確認された。そして、M処理場とN処理場においてNile blue A陽性細菌はAO法、A2O法、CAS法の全ての運転法においてほぼ同程度見られた(表-2)。これまで、活性汚泥によるPHA蓄積は生物学的リン除去との関連で論じられることが多かった。しかし、

PHA蓄積は生物学的リン除去との関連に留まらず、1974年にWallenら¹⁸⁾がはじめてPHAを発見した活性汚泥プロセスは恐らく標準活性汚泥法であり、また、1991年には斎藤ら¹⁹⁾が好気条件で馴致された活性汚泥を用いてPHBの合成を行っている。このようにPHA蓄積は生物学的リン除去を行う嫌気好気法においてのみ観察される代謝ではなく、活性汚泥が広く有する能力であると考えられる。

PHA蓄積速度およびNile Blue A陽性細菌の存在割合については好気、硝酸、亜硝酸、嫌気条件の順に減少する傾向が観察された。一方、PHA転換率は亜硝酸、硝酸、好気の順で減少する傾向があった。なお、M処理場A2O法およびCAS法の嫌気条件については酢酸の摂取量が非常に小さかったために、PHA転換率を評価できなかった。ここで、本研究の結果の妥当性を評価するために、観察されたPHA蓄積速度を既往の知見と比較した。Takabatakeら⁹⁾は東京都内で稼働する複数の実下水処理場から活性汚泥を採取し、酢酸を添加した好気条件下で24時間のバッチ試験を行ない、 $3.8\text{--}48.9\text{mg-C}_{\text{PHA}}/\text{g-MLSS}\cdot\text{h}^{-1}$ を報告している。表-1におけるPHA合成速度の単位をMLVSSからMLSSに補正すると $6.9\text{--}18.3\text{mg-C}_{\text{PHA}}/\text{g-MLSS}\cdot\text{h}^{-1}$ であり、これはTakabatakeらと同等の値であった。好気条件における活性汚泥のPHA蓄積速度は報告があるものの、硝酸、亜硝酸、嫌気条件でのPHA蓄積速度に関しては報告がないため、硝酸、亜硝酸、嫌気条件で観察されたPHA蓄積速度の妥当性は評価できなかった。

PHA蓄積速度が好気、硝酸、亜硝酸、嫌気条件の順に減

表-2 バッチ試験後の活性汚泥に占める Nile blue A 陽性細菌の存在割合およびバッチ試験前の活性汚泥に占める *Candidatus "Accumulibacter phosphatis"*および *Candidatus "Competibacter phosphatis"*の存在割合

処理場	運転法	電子受容体	Nile blue A陽性細菌 の存在割合		<i>Candidatus</i> "Accumulibacter phosphatis"の存在割合		<i>Candidatus</i> "Competibacter phosphatis"の存在割合	
			SD		SD		SD	
M	嫌気/好気法(AO法)	O ₂ (air)	14%	±2%	2%	±1%	1%	±1%
		NO ₃	10%	±1%				
		NO ₂	6%	±2%				
		Anaerobic	6%	±2%				
	嫌気/無酸素/好気法 (A2O法)	O ₂ (air)	16%	±2%	1%	±0%	1%	±1%
		NO ₃	14%	±3%				
		NO ₂	8%	±2%				
		Anaerobic	2%	±1%				
	標準活性汚泥法 (CAS法)	O ₂ (air)	11%	±2%	2%	±1%	Positive*	
		NO ₃	11%	±2%				
		NO ₂	6%	±3%				
		Anaerobic	4%	±2%				
N	嫌気/好気法(AO法)	O ₂ (air)	13%	±4%	2%	±1%	Positive*	
	嫌気/無酸素/好気法(A2O法)	O ₂ (air)	17%	±5%	1%	±1%	1%	±0%
	標準活性汚泥法(CAS法)	O ₂ (air)	10%	±3%	1%	±1%	Positive*	
K	嫌気/好気法(AO法)	O ₂ (air)	15%	±3%	3%	±2%	Positive*	

*ブローブ陽性細菌は観察されるが、定量するためには存在割合が低すぎたものを表す。

少し、PHA転換率が亜硝酸、硝酸、好気の順に減少する傾向が観察されたが、この原因をここで考察する。好気条件において電子受容体となる酸素は硝酸や亜硝酸よりも高い酸化還元電位を有し、細菌は最も効率良くATPの生産を行うことができる。よって、好気条件下では生産したATPを利用してより多くの酢酸を摂取し、PHAを蓄積することができると考えられる。そのため、PHA蓄積速度は好気条件で最も大きくなると考えられる。一方、好気条件では酢酸をPHAとして貯蔵するよりも、細胞自身の増殖のために細胞同化やATP生産に積極的に利用すると考えられる。よって、PHA転換率は好気条件では減少すると考えられる。

電子受容体の違いがPHA蓄積細菌の存在割合に及ぼす影響を評価するために、本研究ではPHA蓄積細菌をNile blue A染色により検出し、Nile blue A染色陽性細菌の全菌に占める割合が各電子受容体条件下でどのように変化するかを定量評価した。本論文ではバッチ試験においてPHAを蓄積した細菌をNile blue A陽性細菌と表現している。これは、PHA蓄積能を有するものの今回実施したバッチ試験ではNile blue A染色で検出されるだけのPHAを蓄積しなかった細菌が活性汚泥中に存在していた可能性があるためである。そのような細菌との混同を防ぐためにNile blue A陽性細菌という表現を用い、Nile blue A陽性細菌の存在割合を定量評価した。本研究で得られたNile blue A陽性細菌の定量結果の妥当性を評価するために既往の知見と比較する。Hanadaら¹⁴⁾は本研究と同様の手法によってPHA蓄積細菌の存在割合を評価しており、実下水処理場の活性汚泥に対して好気条件下で酢酸を用いたバッチ試験を行った結果、1-3割の細菌がPHA蓄積細菌であったことを報告しており、これは本研究の結果(10-17%)と同等の値であった。

Nile blue A陽性細菌の存在割合は好気条件で最も大きく、硝酸、亜硝酸、嫌気条件の順に減少したが、このような結果が得られた原因をここで考察する。好気条件で電子受容体として存在する酸素は最も広く細菌に利用される電子受容体であり、硝酸や亜硝酸は脱窒能を有する細菌によってのみ利用される電子受容体である。Nile blue A陽性細菌の中には好気条件下ではPHAを蓄積したものの、硝酸などは電子受容体として利用できなかったためにPHAを蓄積できなかった細菌が存在したと考えられる。よって、Nile blue A陽性細菌の存在割合は好気条件で最も多く、それと比較して硝酸、亜硝酸、嫌気条件ではNile blue A陽性細菌の存在割合が減少したと考えられる。

ここで、バッチ試験においてNile blue A陽性細菌が酢酸摂取に寄与していた割合を以下の計算式により推定した。計算にあたり、各記号をそれぞれ次のように定めた。

f : Nile blue A陽性細菌が酢酸摂取に寄与した割合

C_{PHA} : 活性汚泥において蓄積されたPHAの量(mg- C_{PHA})

S_{Total} : 活性汚泥が利用した酢酸全量(mg- $C_{acetate}$)

S_{PHA} : 真のNile blue A陽性細菌が利用した酢酸量(mg- $C_{acetate}$)

f は、以下の(1)式により表される。

$$f = S_{PHA} / S_{Total} > C_{PHA} / S_{Total} \quad (1)$$

ここで、

$$f' = C_{PHA} / S_{Total} \quad (2)$$

とすると、

$$S_{PHA} > C_{PHA} \quad (3)$$

であるから、

$$f > f' \quad (4)$$

となる。実験結果からは f の値は求められないが、 f' の値は計算できる。 f' の値は2割-約10割であり、M処理場、N処理場、K処理場の好気条件でそれぞれ5-6割、2-3割、7割であった。また、M処理場の硝酸、亜硝酸条件ではそれぞれ5-8割、7-約10割であった。 f の値、すなわち酢酸の摂取にPHA蓄積細菌が寄与した割合はそれ以上であったと考えられる。よって、活性汚泥による酢酸摂取にNile blue A陽性細菌が大きく寄与していることが f' の値から示された。なお、M処理場A2O法亜硝酸条件下では f' の値が10割を超えてしまうが、添加した酢酸とは別に活性汚泥中から酢酸の供給があり、測定した S_{Total} にはそのような酢酸量が含まれていないために f' の値が10割を上回ったと考えられる。

また、Nile blue A陽性細菌が全菌に占める割合を X_{PHA} [%]とすると、時間のバッチ試験期間におけるNile blue A陽性細菌の酢酸摂取速度 V_{PHA} [mg- $C_{acetate}$ ·g-MLVSS⁻¹·h⁻¹]は(5)式で求められる。

$$V_{PHA} = S_{PHA} \cdot (g-MLVSS \cdot X_{PHA})^{-1} \cdot t^{-1} \quad (5)$$

ここで、

$$V_{PHA}' = C_{PHA} \cdot (g-MLVSS \cdot X_{PHA})^{-1} \cdot t^{-1} \quad (6)$$

とすると、 S_{PHA} と C_{PHA} は(3)式の関係であるため、

$$V_{PHA} > V_{PHA}' \quad (7)$$

となる。M処理場の V_{PHA}' は、好気条件で約300-700mg- $C_{acetate}$ ·g-MLVSS⁻¹·h⁻¹、硝酸条件では約200-500mg- $C_{acetate}$ ·g-MLVSS⁻¹·h⁻¹であり、 V_{PHA} はそれ以上の値であったと考えられる。表-1にあるように、活性汚泥による酢酸摂取速度がM処理場の好気、硝酸条件においてそれぞれ14.9-37.6mg- $C_{acetate}$ ·g-MLVSS⁻¹·h⁻¹、8.1-15.4mg- $C_{acetate}$ ·g-MLVSS⁻¹·h⁻¹であることから、Nile blue A陽性細菌の酢酸摂取速度は活性汚泥の酢酸摂取速度よりも1オーダー高い値であり、Nile blue A陽性細菌が優れた酢酸摂取能を有する事が示唆された。なお、(6)式のMLVSSは生物重量であり、 X_{PHA} はNile blue A陽性細菌の重量が全菌の重量に占める割合であるはずである。しかし、Nile blue A陽性細菌と全菌の重量比は評価していないため、 X_{PHA} にはNile blue A陽性細菌の細胞数が全細胞数に占める割合を用いた。

本研究では電子受容体の違いがPHA蓄積速度、PHA転

換率およびNile blue A陽性細菌の存在割合に影響を及ぼすことを確認した。また、Nile blue A陽性細菌が酢酸摂取に強く寄与し、優れた酢酸摂取能を有することが示唆された。

(3) PHAを蓄積した細菌のうち、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”および*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”の割合

Candidatus “*Accumulibacter phosphatis*”は、その存在割合と生物学的リン除去能の間に相関があることが知られており¹⁶⁾、生物学的リン除去反応を担う細菌であると考えられている。また、*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”は、生物学的リン除去能が悪化した活性汚泥においてしばしば優占する細菌であることから^{8, 9)}、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”の競合細菌として考えられている。生物学的リン除去プロセスにおいては、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”が出来る限り多くの酢酸を摂取し、優占化することが望ましく、逆に*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”のような競合細菌の酢酸摂取への寄与は小さいことが望ましい。これらの細菌が酢酸摂取に寄与する割合を推察するために、これらの細菌がNile blue A陽性細菌群集に占める割合を評価することは一つの方法である。なぜなら、Nile blue A陽性細菌群集は活性汚泥における酢酸摂取に大きく寄与する細菌群であり、Nile blue A陽性細菌群集で*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”が大きい存在割合を有する場合には、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”の酢酸摂取への寄与は大きいと推測できるためである。なお、本研究では*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”と*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”の存在割合はバッチ試験前の活性汚泥試料を用いて定量しており、バッチ試験後の活性汚泥内に存在するNile blue A陽性細菌群集にこれらの細菌が占める割合をこの定量値から推測した。*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”と*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”の存在割合がバッチ試験の前後で変化しなかったことを、N処理場AO法およびA2O法、K処理場AO法の試料を用いて確認しており、バッチ試験前の試料における*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”と*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”の存在割合を用いて、バッチ試験後の活性汚泥内に存在するNile blue A陽性細菌群集にこれらの細菌が占める割合を推測することは可能であると考えられる。

FISH法を用いて*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”および*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”を検出した結果、AO、A2O法に限らず、CAS法の活性汚泥からもこれら細菌が検出された。Wongら²⁰⁾も東京都の下水処理場の活性汚泥を調査し、同様の結果を報告している。よって、これらの細菌は、AO法、A2O法、標準活性汚泥法といった運転条

件の別に関わらず活性汚泥に分布することが推察される。

Candidatus “*Accumulibacter phosphatis*”と*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”が全菌に占める存在割合はそれぞれ1~3%、~1%であった。Wongらは東京都内で稼働する実下水処理場の活性汚泥における*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”と*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”の分布をやはりFISH法により調査し、それぞれ4~18%、3~31%であったと報告している。それに比べると、今回得られた値はやや低いものであった。Wongらは定量のために面積定量法を用いているが、今回の検討では細菌数を計数して評価した。面積定量法では比較的細胞体積の大きい*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”はダイレクトセルカウント法よりも存在割合が大きく評価されてしまう。本研究ではWongらの報告よりも低い定量値を得ているが、妥当な定量値であったと考えられる。

本研究ではFISH法とNile blue Aの逐次染色を組み合わせ、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”と*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”として検出されたプローブ陽性細菌の7~9割が好気、硝酸、亜硝酸条件下でPHAを合成していたことを確認した。バッチ試験前にはNile Blue A陽性細菌はほとんど見られなかったことから、これら細菌は好気、硝酸または亜硝酸条件下でPHAを蓄積したものと考えられる。これらの細菌による、好気条件や硝酸・亜硝酸条件下におけるPHAの蓄積はこれまで確認されておらず、本研究の結果はこれらの細菌が好気、硝酸、亜硝酸条件下においてPHAを蓄積することを示すものである。なお、嫌気条件下でのPHAの蓄積は実験により検証していないが、これら細菌が嫌気条件下において酢酸からPHAを合成することは、Liuら²¹⁾およびNielsenら⁹⁾により既に確認されている。*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”と*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”の7~9割がPHAを蓄積していたことを確認したが、それ以外の1~3割の細菌に関しては、以下の原因によりNile blue A陽性細菌として検出されなかったと考えられる：1. オリゴヌクレオチドプローブによって検出される細菌の中に多様性があり、PHA蓄積能を欠いた細菌も検出された、2. 死菌の状態であったため、酢酸摂取を行わなかった、3. Nile blue A染色で検出できるPHA含有率以下であった。いずれにしても、これら細菌の大半は好気、硝酸、亜硝酸、嫌気条件下でPHA蓄積を行うとみなすことができる。

表2に示した活性汚泥内のNile Blue A陽性細菌の存在割合、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”および*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”の存在割合から、バッチ試験中にPHAを蓄積した細菌に占めるこれら細菌の割合を求めることができる。なお、先に述べたように、*Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*”および*Candidatus* “*Competibacter phosphatis*”の大半はPHA蓄積を行うとみなすことができ

る。 *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*” および *Candidatus* “*Competibacter phosphatis*” が Nile blue A 陽性細菌群集に占める割合は、好気条件については、M処理場、N処理場、K処理場とも1~2割程度であると考えられる。また、M処理場については好気条件だけでなく、硝酸条件、亜硝酸条件、嫌気条件についてもその割合を求めることができる。その値は、硝酸条件において1~3割、亜硝酸条件において2~4割、嫌気条件において5~9割であった。 *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*” と *Candidatus* “*Competibacter phosphatis*” が Nile blue A 陽性細菌群集に占める割合は嫌気条件で最も高かったが、嫌気、亜硝酸、硝酸、好気条件の順にその割合が減少する傾向が観察された。これは亜硝酸、硝酸、好気条件の順に *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*” と *Candidatus* “*Competibacter phosphatis*” 以外に酢酸摂取に寄与したPHA蓄積細菌が増加したことを示している。

5. まとめ

本研究では電子受容体の違いが活性汚泥のPHA蓄積速度、PHA転換率およびNile blue A陽性細菌の存在割合に及ぼした影響を評価した。そして、活性汚泥による酢酸摂取に対してNile blue A陽性細菌が寄与した割合を推定した。また、 *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*” および *Candidatus* “*Competibacter phosphatis*” の存在割合を評価し、Nile blue A陽性細菌に占める割合からこれら細菌が酢酸摂取にどの程度寄与していたか推定した。その結果、以下の知見を得た。

1. PHA蓄積速度、Nile blue A陽性細菌の存在割合は好気、硝酸、亜硝酸、嫌気条件の順に減少し、PHA転換率は逆に上昇した。
2. Nile blue A陽性細菌は活性汚泥による酢酸摂取に2~10割寄与したことが示唆された。また、Nile blue A陽性細菌が優れた酢酸摂取能を有することも示唆された。
3. *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*” および *Candidatus* “*Competibacter phosphatis*” は運転法の違いに関係なく活性汚泥試料から共通して検出され、好気、硝酸、亜硝酸条件下においてPHAを蓄積した。
4. *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*” および *Candidatus* “*Competibacter phosphatis*” がPHA蓄積細菌群集に占める割合は好気条件で1~2割、硝酸条件において1~3割、亜硝酸条件において2~4割、嫌気条件において5~9割と推定された。活性汚泥による酢酸摂取へのこれら細菌の寄与は好気、硝酸、亜硝酸、嫌気条件の順に大きくなることが示唆された。

6. 謝辞

本研究は文部科学省科学研究費（若手研究（B）、課題番号17710057「活性汚泥中のPHA蓄積細菌群集の解明と廃水からの生分解性プラスチック生産への応用」）の助成を受けて遂行したものである。また、本研究で用いた活性汚泥試料は東京都下水道局より分譲して頂いた。ここに記して、感謝の意を表する。

7. 参考文献

1. Van Loosdrecht M.C.M., Pot M.A. and Heijnen J.J.: Importance of Bacterial Storage Polymers in Bioprocesses, *Water Sci Technol*, Vol. 35, No. 1, pp.41-47, 1997.
2. Ramsay B.A., Lomaliza K., Chavarie C., Dube B., Bataille P. and Ramsay J. A.: Production of Poly- (β -Hydroxybutyric-Co-3-Hydroxyvaleric) Acids, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.56, No. 7, pp.2093-2098, 1990.
3. Gomez J.G.C., Rodrigues M.F.A., Ali R.C.P., Torres B.B., Bueno Netto C.L., Oliveira M.S. and da Silva L.F.: Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 45, pp.785-791, 1996.
4. Takabatake H., Satoh H., Mino T. and Matsuo T.: PHA (polyhydroxyalkanoate) Production Potential of Activated Sludge Treating Wastewater, *Water Sci Technol.*, Vol. 45, No. 12, pp.119-126, 2002.
5. Beun J.J., Paletta F., Van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J.: Stoichiometry and Kinetics of Poly- β -Hydroxybutyrate Metabolism in Aerobic, Slow Growing, Activated Sludge Cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 67, No. 4, pp.379-389, 2000.
6. Gujer W., Henze M., Mino T. and van Loosdrecht M.: Activated Sludge Model No. 3, *Water Sci Technol.*, Vol. 39, No. 1:183-193, 1999.
7. Hesselmann R.P.X., Werlen C., Hahn D., Van Der Meer J. R. and Zehnder A.J. B.: Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge, *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 22, pp.454-465, 1999.
8. Nielsen A.T., Liu W.T., Filipe C., Grady J.R. L., Molin S. and Stahl D.A.: Identification of a Novel Group of Bacteria in Sludge from a Deteriorated Biological Phosphorus Removal Reactor, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 65, No. 3, pp.1251-1258, 1999.
9. Seviour R.J., Mino T. and Onuki M.: The Microbiology of Biological Phosphorus Removal in Activated Sludge Systems, *FEMS Microbiol. Reviews*, Vol. 27, pp. 99-127, 2003.
10. American Public Health Association.: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Washington, D.C., 1992.
11. Satoh H., Ramey W.D., Koch F.A., Oldham W.K., Mino T. and

- Matsuo T.: Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage, *Water Sci. Technol.*, Vol. 37, No. 4-5, pp.9-16, 1996.
12. Satoh H., Mino T. and Matsuo T.: Uptake of Organic Substrates and Accumulation of Polyhydroxyalkanoates Linked with Glycolysis of Intracellular Carbohydrates under Anaerobic Conditions in the Biological Excess Phosphate Removal Process, *Water Sci. Technol.*, Vol. 26, No. 5-6, pp.933-942, 1992.
 13. Beer M., Kong Y.H. and Seviour R.J.: Are Some Putative Glycogen Accumulating Organisms (GAO) in Anaerobic : Aerobic Activated Sludge Systems Members of the *α-Proteobacteria*?, *Microbiology*, Vol. 150, pp.2267-2275, 2004.
 14. Hanada S., Satoh H. and Mino T.: Measurement of microorganisms with PHA production capability in activated sludge and its implication in Activated Sludge Model No. 3, *Water Sci. Technol.*, Vol. 45, No. 6, pp.107-113, 2002.
 15. Amann R.: *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Ecology Manual*, Vol. 3.3.6, pp.1-15, 1995.
 16. Crocetti G.R., Hugenholz P., Bond P.L., Schuler A., Keller J., Jenkins D. and Blackall L.L.: Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and Design of 16S rRNA-Directed Probes for Their Detection and Quantitation, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 66, No. 3, pp.1175-1182, 2000.
 17. Kong Y.H., Ong S.L., Ng W.J. and Liu W.T.: Diversity and Distribution of a Deeply Branched Novel Proteobacterial Group Found in Anaerobic-Aerobic Activated Sludge Processes, *Environ. Microbiol.*, Vol. 4, No. 11, pp.753-757, 2002.
 18. Wallen L. and Rohwedder W.K.: Poly-β-hydroxyalkanoate from activated sludge, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 8, pp.576-579, 1974.
 19. 斉藤祐二, 友沢孝, 活性汚泥からの生分解性プラスチック生成に関する研究 - 窒素制限基質における PHB の生産と高蓄積化条件の検討 -, 衛生工学研究論文集, Vol. 27, pp.175-181.
 20. Wong M.T., Mino T., Seviour R.J., Onuki M. and Liu W.T.: *In situ* Identification and Characterization of the Microbial Community Structure of Full-Scale Enhanced Biological Phosphorous Removal Plants in Japan, *Water Res.*, Vol. 39, pp.2901-2914, 2005.
 21. Liu W.T., Nielsen A.T., Wu J.H., Tsai C.S., Matsuo Y. and Molin S.: *In situ* Identification of Polyphosphate- and Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Traits for Microbial Populations in a Biological Phosphorus Removal, *Environ. Microbiol.*, Vol. 3, No. 2, pp.110-122, 2001.

(2006. 5.26 受付)

Contribution of PHA-accumulating Organisms to Acetate Uptake by Activated Sludge Microorganisms

Mamoru OSHIKI¹, Motoharu ONUKI², Hiroyasu Satoh¹ and Takashi MINO¹

¹Inst. of Environmental Studies, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

²Integrated Research System for Sustainability Science, The University of Tokyo

The contribution of PHA-accumulating organisms to acetate uptake was estimated by the batch experiments using activated sludge sample taken from full-scale wastewater treatment plant and dual staining of Nile blue A and DAPI was applied to activated sludge sample in order to evaluate the abundance of PHA-accumulating organisms. The results suggested that 20 to almost 100% of acetate had been taken by the member of Nile blue A positive cells and their population accounted for 10 to 20% in activate sludge incubated under aerobic condition. In order to estimate the contribution of *Candidatus* "Accumulibacter phosphatis" and *Candidatus* "Competibacter phosphatis" to acetate uptake, their population were quantified by fluorescent *in-situ* hybridization (FISH) analysis, and they accounted for 10 to 90% of population of Nile blue A positive cells.