

# 高濃度塩分環境下に生息するポリリン酸蓄積細菌の集積培養

広島大学大学院工学研究科 学生会員 ○間口 暢之  
非会員 小寺 博也  
非会員 阿部 憲一  
正会員 金田一 智規  
正会員 尾崎 則篤  
正会員 大橋 晶良

## 1. はじめに

ポリリン酸蓄積細菌（以下 PAOs）は生物学的リン除去（EBPR）システムの要となる存在であり、下水からリンを回収する能力を持つ微生物として知られている。しかし、海洋などの高濃度塩分下に生息する PAOs は一種類のみ知られているだけであり<sup>(1)</sup>、未だにその生態や機能構造については未解明な部分が多い。高濃度塩分下に生息する PAOs の知見を得ることができれば、海洋中や高濃度塩分下に存在するリンの回収技術への適用、バクテリアの海洋中のリン循環の関与の解明につながると考えられる。そこで本研究では、高濃度塩分下に生息する PAOs の集積培養を目的として、微生物保持能力に優れた DHS (downflow hanging sponges)リアクターを用いて、リンの摂取・放出の確認と微生物群集解析を行った。

## 2. 実験方法

実験には、内径 5 cm、高さ 120 cm、全容積約 2.2 L の円筒形の密閉容器に 2 cm 角のスポンジ担体 25 個（全容積 200 cm<sup>3</sup>）を吊るした DHS リアクターを用いた。スポンジ担体には有明海沿岸の干潟の泥を植種し、20℃で運転を行った。リアクターは嫌気条件と好気条件を交互に繰り返すように制御し、嫌気条件 3 時間、好気条件 9 時間の 1 サイクル 12 時間で運転を行った。以下に運転の流れを説明する(図 1)。

①好気時：リアクター上部から好気流入水を 9 時間（HRT 30 min）散水させ、処理水はそのまま排出する。②嫌気開始時：好気流入を止め、嫌気流入水 2.2 L を 5 分間でリアクター内に満たして 3 時間静置する。この時、窒素ガスも同時に流入させリアクター内の酸素を追い出す。③嫌気終了時：リアクター内に満たされている嫌気処理水を 5 分間で排出し、再び①の好気時の運転に戻る。好気、嫌気基質共にリン濃度は 5 mgP・L<sup>-1</sup> とした。さらに嫌気基質には Phase 1 (day 0-67) 及び Phase 3 (day 209-) では酢酸ナトリウム 200 mgCOD・L<sup>-1</sup>、Phase 2 (day 68-208) では酢酸ナトリウム 100 mgCOD・L<sup>-1</sup>、プ

ロピオン酸ナトリウム 100 mgCOD・L<sup>-1</sup> を添加した。また、嫌気基質は窒素ガスで 1 時間パージし、基質タンクに酸素が混入しないように窒素ガスを充填したガスバッグを取り付けた。なお、好気、嫌気基質共に人工海水 sealife（マリンテック社製）を 35 g・L<sup>-1</sup> になるように加えた。

運転 199 日目 (phase 2) に、スポンジ担体の表面のバイオマスを採取して DNA 抽出を行い、16SrRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。プライマーセットは全細菌を対象とする EUB338mixf・Univ1389r を用いた。

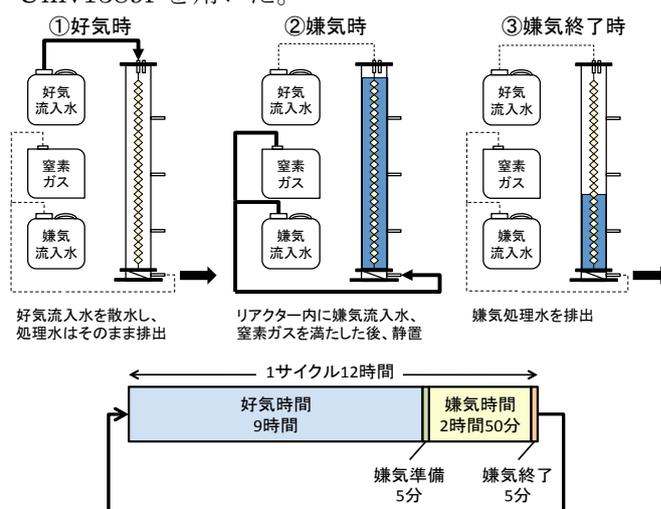


図 1 リアクター運転の流れ

## 3. 実験結果

### 3-1 リアクターパフォーマンス

好気、嫌気時の流入、流出濃度の推移を図 2、3 に示す。実験開始時は嫌気基質の有機物は酢酸ナトリウムのみとしていた (Phase 1) が、リン濃度に何の変化も見られなかった。これは高濃度塩分下に生息する PAOs が酢酸を利用できず、増殖できていないためではないかと考えられたため、運転 68 日目に有機物を酢酸ナトリウムとプロピオン酸ナトリウムに変更した (Phase 2)。すると、運転 100 日目頃からリンの摂取・放出を確認できるようになり、リンの摂取・放出は運転 135 日目頃から定常状態となった。

運転 209 日目から有機物を酢酸ナトリウムのみとしたところ、リンの摂取・放出に何の変化も見られなかった。Phase 1 でリンの摂取・放出が見られなかったのは、有機物組成が原因ではなく、微生物の増殖速度が遅かったためではないかと考えられる。好気時では、約  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  の好気流入水が  $2.1 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$  にまで低下し、1 サイクル当たりのリン摂取量は  $10.44 \text{ mgP}$  だった。嫌気時では約  $5 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$  の嫌気流入水は  $9.6 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$  にまで上昇し、1 サイクル当たりのリン放出量は  $10.1 \text{ mgP}$  であり、ほぼ一致した。このように嫌気好気環境を繰り返すことで、高濃度塩分環境下でも淡水性 PAOs と同様にリンの摂取・放出を行う菌が存在するということが確認できた。

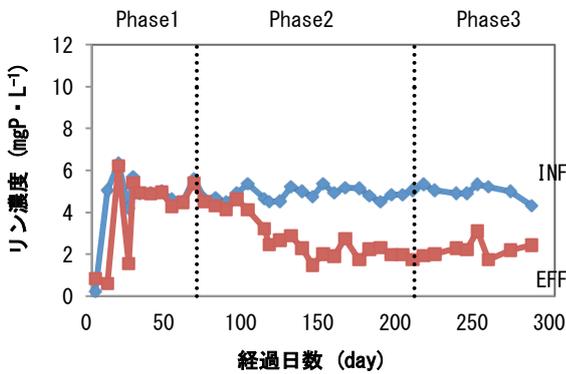


図 2 好気時のリン濃度の推移

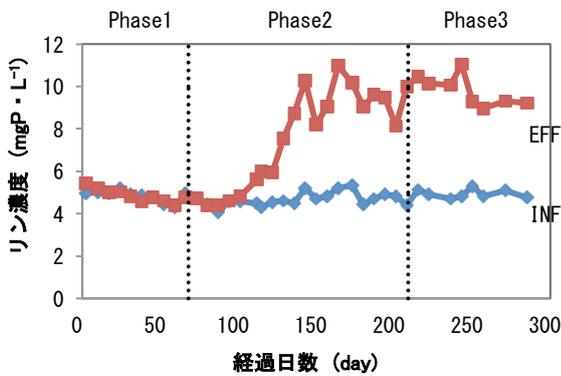


図 3 嫌気時のリン濃度の推移

### 3-2 菌叢構造解析結果

運転 199 日目 (Phase 2) にスポンジ担体の表面部から採取したバイオマスについてクローニング解析を行ったところ、53 クローンが解析できた。そして、 $\alpha$ -proteobacteria の *Rhodospirillaceae* 科に属する菌が 13 クローン、 $\beta$ -proteobacteria の *Rhodocyclaceae* 科に属する菌が 16 クローン検出さ

れ、この 2 種類の微生物群が優占化していることが確認できた。図 4 に *Rhodocyclaceae* 科に関する系統樹、図 5 に *Rhodospirillaceae* 科に関する系統樹を示す。赤文字で示したものが今回検出された菌である。図 4 を見ると、今回検出された *Rhodocyclaceae* 科に属する菌は、下水処理場の EBPR システムで見られる PAOs である *Accumulibacter* と 98% の相同性であり、この菌がリンの摂取・放出を行っていると考えられる。また、図 5 を見ると、今回検出された *Rhodospirillaceae* 科に属する菌は、PAOs の競合細菌であるグリコーゲン蓄積細菌 (GAOs) の一種として知られている *Defluviicoccus* と近縁な種であることが確認された。現在、*Defluviicoccus* は 4 つのグループに分けられているが、最も近縁なグループである cluster 3 との相同性は 96% であり、今回検出された菌は新種の GAOs である可能性がある。

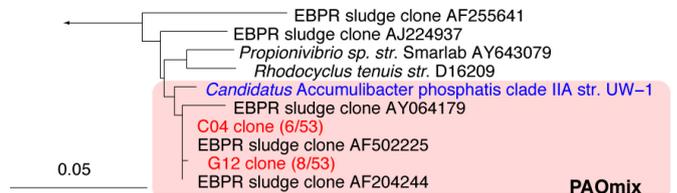


図 4 *Rhodocyclaceae* 科に関する系統樹

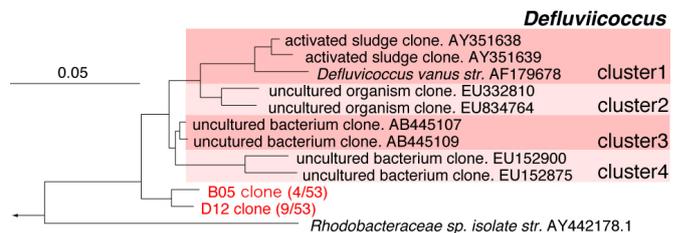


図 5 *Rhodospirillaceae* 科に関する系統樹

### 4. まとめ

本研究では、高濃度塩分環境下でも淡水性 PAOs と同様にリンの摂取・放出を行う菌が存在するということが確認できた。また、今回検出された PAOs は、EBPR プロセスで見られる PAOs と近縁種であることが確認できた。

### 参考文献

(1) Schulz et al. (2005) *Science*, 307, pp. 416 – 418

### 謝辞

本研究は NEDO の「微生物群のデザイン化による高効率型バイオ処理技術開発」の助成を受けて実施された。記して謝意を表す。