自然界に生存するポリリン酸蓄積細菌の多様性

広島大学大学院工学研究科　学生会員　○長井　洋亮
広島大学大学院工学研究院　正会員　小寺　博也
広島大学大学院工学研究院　正会員　金田一智規
広島大学大学院工学研究院　正会員　尾崎　則篤
広島大学大学院工学研究院　正会員　大橋　晶良

1.研究背景・目的

ポリリン酸蓄積細菌（以下 PAOs）は生物学的リン除去（EBPR）プロセス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。一方で、活性汚泥から培養された PAOs が耐塩性を有するということはこれまでに報告されていない [1]。海洋底泥からは下水処理場で検出されていない未知 Accumulibacter グループのポリリン酸キナーゼ（*ppk*1）遺伝子が発見されており [2]、活性汚泥中の PAOs と異なる能力を有する PAOs が自然界に存在することが報告されている。我々の研究グループでは嫌気好気条件を繰り返す Down-flow Hanging Sponges (DHS)リアクターを用い、干潟底泥を植種源として、高塩分環境下での PAOs の集積培養に成功している [3]。その微生物解析を行った結果、EBPR プロセスにおいてリン除去を担う主要な微生物である *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis' (Accumuliacter)と非常に近縁な種であり、Accumulibacter が耐塩性である事が示唆された。そこで干潟底泥同様に活性汚泥中にも耐塩性 PAOs が生存するか明らかにするため、本研究では活性汚泥と干潟底泥を植種源とした海水・淡水基質による PAOs の集積培養実験を行った。そして、微生物解析により自然界に生存するポリリン酸蓄積細菌の多様性を探った。

2.実験方法

本実験では、東広島浄化センターの活性汚泥と佐賀県有明海（緯度 33.17、経度 130.28）の干潟底泥の 2 種類を植種源として用いた。内径 5 cm、高さ 15 cm、全容積約 0.3 L の円筒形のガラスカラムに 2 cm 角のスポンジ担体 5 個（全容積 40 cm^3）を吊るした DHS リアクターを 20℃の恒温室に設置して、嫌気条件と好気条件を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（図 1）。

海水条件の基質には人工海水 sealife（マリンテック社製：塩分濃度 35 g・L^{-1}）を添加し、淡水条件の基質には下水を模擬したミネラル、微量元素を添加した。好気、嫌気基質共にリン濃度は 5 mgP・L^{-1}、アンモニア性窒素は 1 mgN・L^{-1} とした。さらに嫌気基質には C_2H_5COONa と CH_3COONa を各 100 mgCOD・L^{-1} ずつ添加し、窒素ガスで 1 時間パージした。活性汚泥と干潟底泥の 2 種類の植種源でそれぞれ 4 つの条件（Run-1 好気：海水・嫌気：海水、Run-2 好気：淡水・嫌気：淡水、Run-3 好気：淡水・嫌気：海水、Run-4 好気：海水・嫌気：淡水）の計 8 系列リアクターを運転した（Phase 1）。その後、Run-1 と Run-2 の条件を互いに入れ替え、同様に Run-3 と Run-4 の条件も互いに入れ替えた（Phase 2）。干潟底泥については運転 90 日目（Phase 1）に、スポンジ担体のバイオマスを採取し DNA 抽出を行い、クローン解析を行った。プライマーセットは Accumulibacter のポリリン酸キナーゼ（*ppk*1）遺伝子をターゲットとした *ppk1* 254f-1376r を用いた。

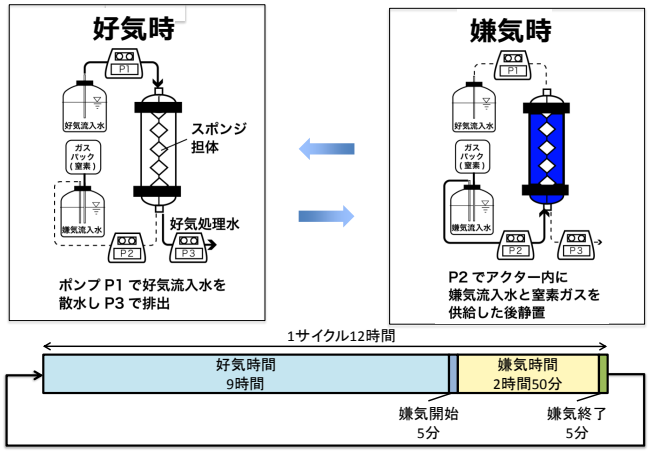

図 1　リアクター運転の流れ

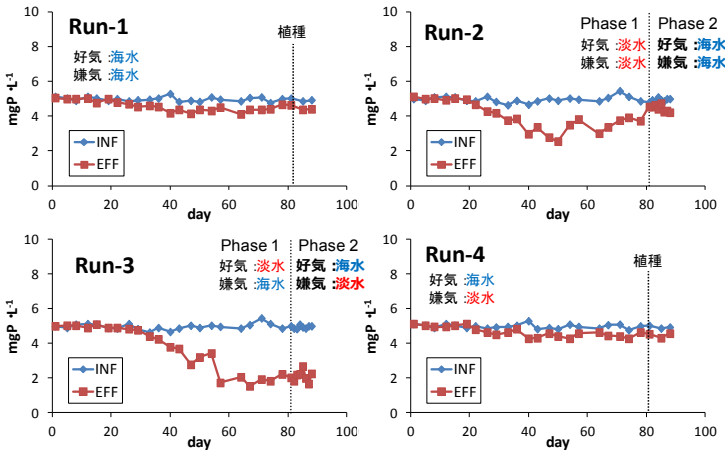

図 2　好気時のリン濃度の推移（植種源：活性汚泥）

3.結果と考察

1) PAOs 集積培養実験

活性汚泥を植種源とした場合（図 2）、運転一ヶ月頃から Run-2、Run-3 ではリンの摂取が確認できた。Run-3 では Run-2 に比べ高いリン摂取能力がみられた。一方で Run-1、Run-4 では最後までリン摂取は行われなかった（Phase 1）。Run-1、Run -4 では運転 81 日目に再度活性汚泥を植種したが、その後リン摂取は行われなかった。次に、PAOs の耐塩性を調べるため、81 日目にリン摂取

が行われた Run-2、Run-3 の淡水基質と海水基質を交換した（Phase 2）。その結果、Run-3 はリンの摂取を維持したが、Run-2 ではリン摂取が行われなくなった。すなわち、活性汚泥中の PAOs は海水条件ではリン摂取できないことが分かった。Run-4 ではリン除去が行われなかったにもかかわらず、Run-3 を切り替えた後はリン摂取が維持されていた。よって、Run-4 の基質条件では PAOs はリン摂取できるが、増殖できないと考えられる。

一方、干潟底泥を植種源とした場合（図 3）、全ての条件でリン摂取が行われ、淡水・海水基質の両方で培養できた（Phase 1）。さらに、93 日目に淡水基質と海水基質の交換を行っても、すべてのリアクターでリン摂取が維持された。Run-1 では切り替え 1 日目はリン摂取しなかったが、2 日目からは再びリン摂取するという傾向が見られた。この傾向は PAOs が塩濃度の変化により一時的にダメージを受けたが、その後順応したと思われる（Phase 2）。以上の結果から、干潟底泥中に存在する PAOs は、海水・淡水基質条件に関わらず培養できる事が明らかになった。

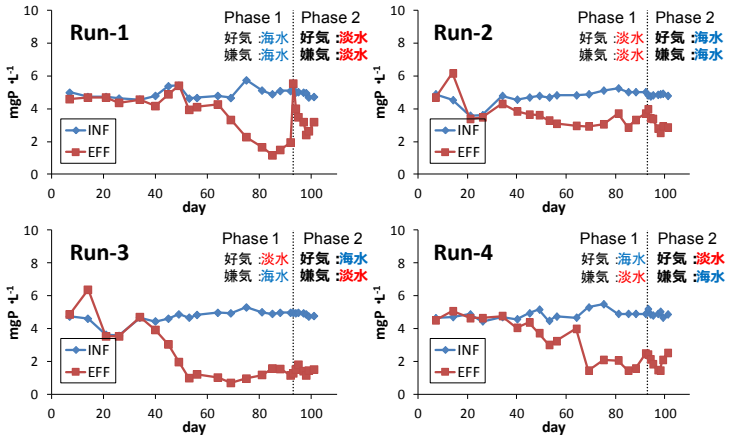

図 3　好気時のリン濃度の推移（植種源：干潟底泥）

2) *ppk*1 遺伝子に基づく系統解析

干潟底泥について運転 90 日目（Phase 1）にスポンジ担体のバイオマスを採取しクローン解析を行ったところ、Run-1 では 33 クローン、Run-2 では 27 クローン、Run-3 では 26 クローン、Run-4 では 30 クローンが解析できた。図 4 に *ppk*1 遺伝子に基づく系統樹を示す。赤文字で示したものが今回検出されたクローンである。Accumulibacter は脱窒能力を有する Type I と有さない Type II に大きく分類される。その中で Type I は I A から I E までのグループが報告されている [2]。今回の干潟底泥で検出された菌は全て Type I に属していた。また、Type I の中でも I A から I E に属さない新種のクローン（I unknown）も検出され、干潟底泥には多様な Accumulibacter が存在していた。

活性汚泥では一般的に Accumulibacter は Type II と Type I A が検出される。今回 Type I A は干潟底泥でも検出されており、Type I A は淡水と高濃度塩分環境下でも生存できることが示唆された。興味深いことに活性汚泥を植種源とし海水で培養を行った Run-1 ではリン摂取は行われなかった。Type I A は海水ではリン摂取はするが、増殖はしないと考えられる。

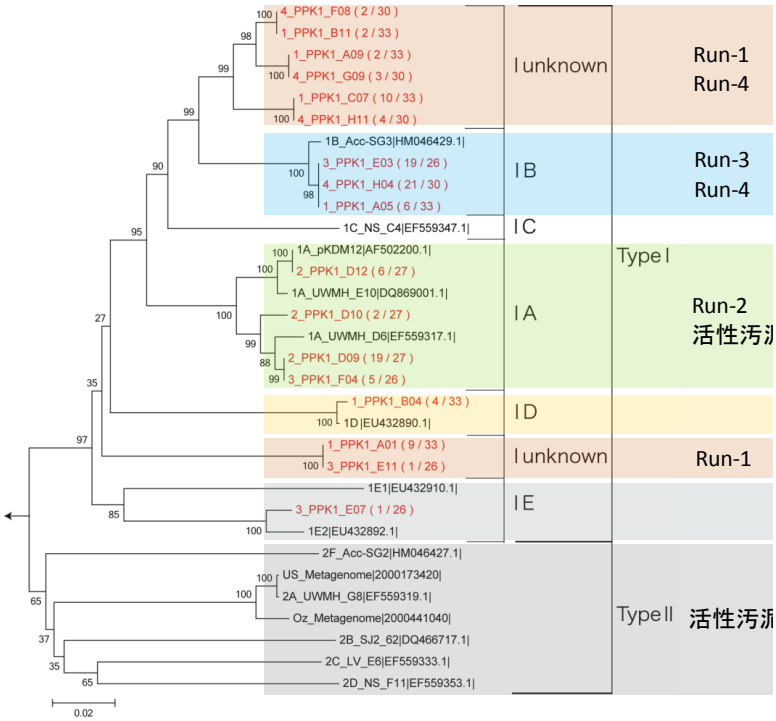

図 4　*ppk*1 遺伝子に基づく系統樹

4.まとめ

活性汚泥を植種源とした場合、Run-2（好気：淡水・嫌気：淡水）と Run-3（好気：淡水・嫌気：海水）の条件でリン摂取を確認できた。一方、干潟底泥中を植種源とした場合、海水・淡水基質条件に関わらずリン摂取を確認できた。

干潟底泥について *ppk*1 遺伝子に基づくクローン解析を行った結果、活性汚泥と異なる多様な Accumulibacter が存在していることが示された。また、これまで検出されていない新種の Accumulibacter も発見された。

本研究により活性汚泥以外の自然界にも多様なポリリン酸蓄積細菌が生存していることが確認できた。

5.参考文献

1) Bassin et al. 2011. Environ. Microbiol. Vol.77.pp.7942-7953.

2) Peterson et al. 2008. Environ. Microbiol. Vol. 10 (10). pp. 2692-2703.

3) 小寺ら 2013. 土木学会論文集 G (環境). Vol. 69 (7) pp. 523-530.