

VII-163

高温培養グラニューールのFISH法による生態学的構造解析

長岡技術科学大学 学○多川 正、正 原田秀樹、大橋晶良、珠坪一晃

1.はじめに

近年高温・高速メタン発酵プロセスの下・廃水処理への導入が進んでいる。これは有機物分解を担う高温性メタン生成細菌は中温菌よりも数倍高い活性を持つことから、反応器の高負荷運転が可能であるためである。その中でも高温UASB法は嫌気性微生物の自己集塊化機能を利用し、汚泥滞留時間を維持し、反応器内に高濃度のグラニューール汚泥を形成、保持することで高負荷、超高速処理が可能である。しかしながら高温培養グラニューールの生態学的な構造については不明な点が多く、良好な高温培養グラニューールの形成技術確立のためには、これらの知見を収集する必要がある。珠坪、原田らは高温グラニューール汚泥はFig.1に示したように中温グラニューール汚泥とはかなり構造の異なる二重構造であることを報告している¹⁾。そこで本研究では、メタン生成細菌を特異的に検出する16SrRNAプローブを開発し、FISH(Fluorescence In Situ Hybridization)法により高温グラニューール表層部分、内部における酢酸及び水素資化性メタン生成菌の存在率の定量化を行った。

2.実験方法

2.1 16SrRNAプローブ及び試料グラニューール

実験にはA rchaeaを特異的に検出するA rch915 (5' GTGCTCCCCCGCCAATTCCT 3')と、*Methanosaeta*を特異的に検出するMT757 (5' CCUAGCUUUCGUCCCUUG 3')、*Methanobacterium*を検出するM B318 (5' CUUGGACUCUGUCCAAGGU 3')の3種類の16SrRNAプローブを使用した。プローブの5' 末端には蛍光標識であるテトラメチルローダミン (G励起: 545nm)を付加しており、DAPI (U励起: 380nm)との二重染色、同一視野観察が可能である。実験には2種の高温(55℃)培養グラニューール(アルコール蒸留廃水培養、シュクロース培養)と培養温度の比較として1種の中温(35℃)培養グラニューール(シュクロース培養)を用いた。

2.2 外側、内側サンプルの作成

試料はグラニューールをステンレスナイフで厚さ0.1~0.2 mm程度にスライスしたものを、実体顕微鏡で観察しながら外側と内側とに分離して回収し、分散処理後、パラフォルムアルデヒド溶液(4%PHA、390mM PBS Buffer、4℃、12hr)によって固定した後、FISHのサンプルとした。

2.3 FISH法

In-Situ Hybridization法は、Amann²⁾の方法に準拠した。Hybridizationはゼラチンコーティングしたスライドガラス上で行った。固定した微生物試料8μlをスライド表面に塗布し、空気乾燥、エタノール脱水を施した後、Hybridization Buffer 8μl (0.9M NaCl、20mM Tris HCl、0.01% SDS、FA 0~35%、PH 7.2)と1μlのプローブを滴下してHybridizeした。Hybridization温度はArch 915とMT757 probeは46℃、MB318 probeは40℃である。また洗浄はHybridization Bufferを用いてArch915、MT757は

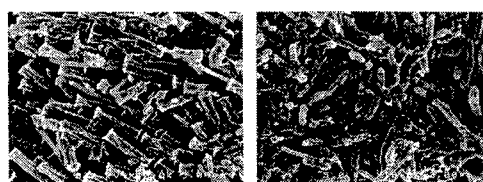


Fig.1 SEM photographs of thermophilic granular sludge. Interior structure of granular sludge.

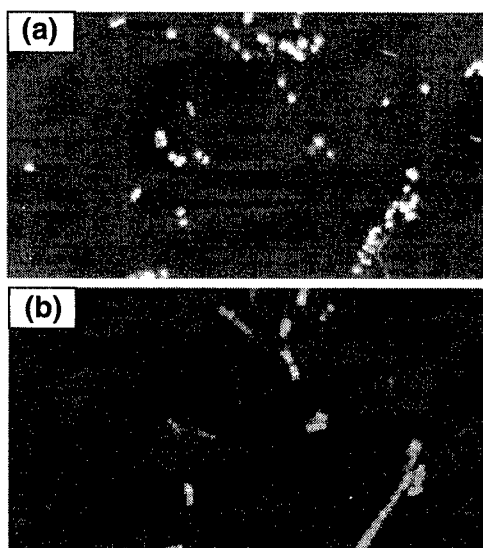


Fig.2 Fluorescence micrographs of granular sludge. (a) dyed with DAPI and (b) Hybridized by MT757 probe

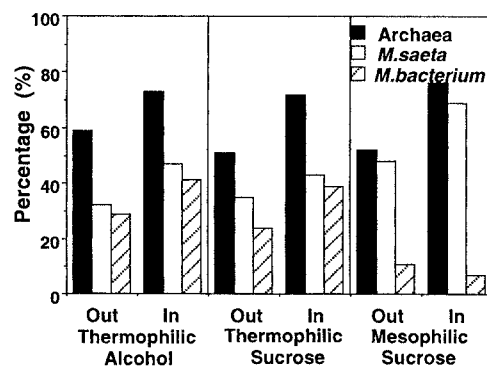


Fig.3 Population size of Methanogenic bacteria.

キーワード：高温グラニューール、FISH法、メタン生成細菌、古細菌、UASB

〒940-21 長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学 環境システム (0258) 46-6000 6313

48℃、MB318は42℃でそれぞれ20分間洗浄した後、DAPI染色を施した。サンプルは落射型蛍光顕微鏡によって観察、写真撮影を行い画像解析により全菌数(DAPI)に対するTargetbacteria数で存在率を算出した。

3. 実験結果及び考察

Fig.2に蛍光顕微鏡写真の一例を示す。(a)はDAPI観察で(b)はMT757プローブをHybridizeした観察結果である。これより、フラットエンドセプトラムを持つ、*M.saeta*だけが特異的に検出されているのが確認できる。Fig.3に各プローブによって検出されたMethanogenの存在率を示す。Archaeaの存在率について着目すると、高温汚泥では外側が59%、51%であり内側は73%、72%と内側の方がArchaeaの存在率が高い。中温汚泥も外側が52%、内側が76%と高温汚泥と同様に内側の方がArchaeaの存在率が高くなっている。これより、培養温度に関係なくグラニュールの外側には酸生成菌等の非古細菌などが多く存在していると思われる。

Fig.4,5にはArchaeaに対する*M.saeta*、*M.bacterium*の占める割合を示した。*M.saeta*について着目すると、中温汚泥は*M.saeta*の占める割合が外側で92.3%、内側では90.8%に対して、高温汚泥は外側68.6%、内側59.7%と中温汚泥の方が*M.saeta*の占める割合が高くなっている。一方、*M.bacterium*について着目すると中温汚泥の外側21.2%、内側9.2%に対し、高温汚泥の方は外側47.1%、内側では54.2%と高温汚泥の方が*M.bacterium*の占める割合が数倍高く、特に内側に多く存在している。

Fig.6に有機物の嫌気的分解経路を示す。中温度域では電子フローベースで約60-70%の有機物が酢酸を経由してメタンへと転換し、残りの約30%が水素からメタンへと転換されるが、高温メタン発酵系は中温系と比較すると酢酸を酸化して水素を生成し、水素資化性メタン生成細菌によってメタンへと転換する反応が卓越する³⁾。このことより、高温培養の方が、中温培養と比較して、水素資化性メタン生成細菌*M.bacterium*の存在率が高くなり、そのかわりに酢酸資化性の*M.saeta*の存在率が中温培養と比較して低くなっていると考えられる。

4. まとめ

FISH法を高温培養グラニュールに適用することにより、内部には*M.saeta*が、中心部には*M.bacterium*が優占菌種となっていることが確認でき、水素資化性の*M.bacterium*の存在率が中温培養と比較して高かったことから、高温メタン発酵系では酢酸酸化・水素経路からのメタン生成反応が卓越していると考えられた。

参考文献

- 1) 珠坪、原田ら：高温UASBリアクターによるアルコール蒸留廃水処理特性と保持微生物群の生態学的挙動、1995、環境工学研究論文集、32、201-212
- 2) Amann, R.I.: Molecular Microbial Ecology Manual, 1995、Kluwer Academic Publishers, 3.3.6、1-15
- 3) 珠坪、原田ら：高温メタン発酵系における酢酸酸化・水素生成経路のメタン生成経路の生態学的意義、1996、環境工学研究論文集、33、205-214

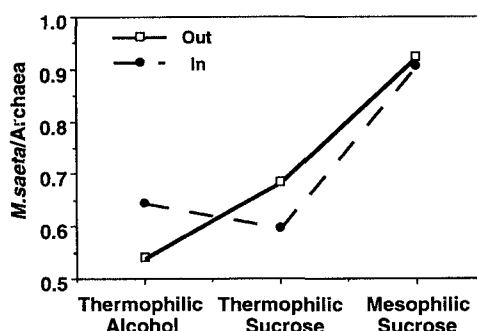


Fig.4 Ratio of *Methanosaeta* vs. Archaea.

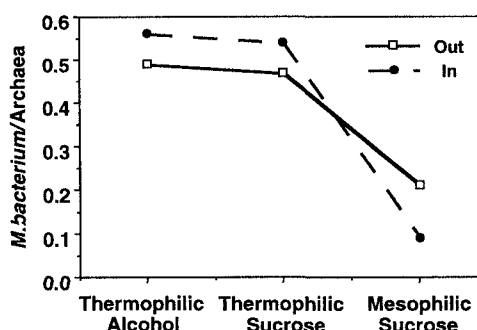


Fig.5 Ratio of *Methanobacterium* vs. Archaea.

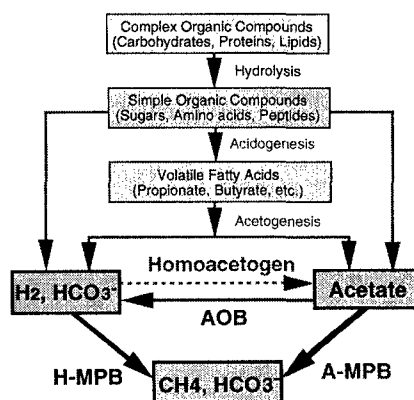


Fig. 6 Schematic diagram for anaerobic digestion of organic compounds.
AOB: Acetate-Oxidizing Bacteria
A-MPB: Acetate-utilizing methanogens
H-MPB: Hydrogen-utilizing methanogens