

VII-268

16SrRNAターゲットFISH法によるUASBグラニューール内のメタン菌の定量

長岡技術科学大学 学生員 大関弘和、 正会員 原田秀樹、大橋晶良、珠坪一晃、 学生員 関口勇地

1. はじめに

UASBリアクターは高濃度の産業廃水処理に対して広く普及しているが、低濃度の都市下水処理への適用に関する研究も進められている。UASB内に保持されている嫌気性微生物群から成るグラニューールの生態は、走査型電子顕微鏡観察等により明らかにされている事も多いが、グラニューール内の菌叢の構成比などは未だに知見が乏しい。このため新規のツールを用いて、グラニューールの生態学的構造を解明する必要がある。

近年、菌種に共通な16SrRNA遺伝子内のある特異的な配列とハイブリダイズする遺伝子プローブを用いたFISH (Fluorescent In Situ Hybridization) 法が開発されており、細菌内の16SrRNA遺伝子とハイブリダイズさせた後の蛍光の有無を調べることで、細菌の種の同定や定量化ができる。

本研究では、遺伝子工学的手法のFISH法を用いて各種の下・廃水処理UASBリアクター内のグラニューール汚泥のArchaeaと*Methanosaeta*を定量化すると共に、メタン菌量とメタン生成活性との関係について調べた。

2. 実験方法

2.1 微生物試料

実験に使用したUASBグラニューールは本研究室で培養している5種類で、その他、比較のために消化汚泥も調べた。Table1には、使用した汚泥の培養温度、容積負荷、全メタン生成活性（酢酸および水素を基質としたメタン生成活性の合計）、酢酸を基質としたメタン生成活性を示した。

Table 1 Operating conditions of UASB reactors

Granule	Symbol	Temp (°C)	Loading (KgCOD/m ³ /d)	Total Activities (gCOD/gVSS/d)	Acetato Activities (gCOD/gVSS/d)
Thermophilic (Alcohol distillery)	✕	55	100.0	19.00	3.0
Thermophilic (Sucrose)	▲	55	23.0	8.00	2.0
Mesophilic (Sucrose)	✱	35	7.8	3.20	2.4
Mesophilic (Milk)	●	35	4.8	2.90	1.4
Digester sludge	▲	30	1.0	0.25	0.1
Sewage UASB	■	20	1.5	0.28	0.1

2.2 In Situ ハイブリダイゼーション法

FISH法に用いたDNAプローブは2種類で、ArchaeaをターゲットとするArch915(3'TCCTTAACCGCCCTCGTG5')、*Methanosaeta*に特異的にハイブリダイズするMT757(3'GUUCCUGCUUUCGAUCC 5')を用いた。それぞれ5'末端に蛍光標識としてテトラメチルローダミンを付加した。

ハイブリダイゼーション法は、Amann¹⁾の方法に準拠した。まず、微生物試料を4%パラホルムアルデヒド溶液（4%パラホルムアルデヒド、390mM PBS buffer、4°C、5hr）で固定し、ホモジナイズおよび超音波処理して試料を分散させ、ゼラチンコートしたスライドガラス上に分散試料8μLを滴下し、室温乾燥した後エタノール脱水を施した。次にArchaeaの場合、Hybridization buffer 8μL (0.9M NaCl、20mM Tris-HCl pH7.2、0.01% SDS、FA30%) とArch915プローブ1μLを滴下してハイブリダイズさせ、*Methanosaeta*の場合にはHybridization buffer 8μL (0.9M NaCl、20mM Tris-HCl pH7.2、0.01% SDS、FA 20%) とMT757プローブを滴下しハイブリダイズした。両プローブともハイブリダイズ条件は46°C、2hrで、洗浄は48°C、20minである。洗浄後DAPIで2重染色し、落射蛍光顕微鏡により観察・写真撮影して、全菌数に対するArchaeaあるいは*Methanosaeta*

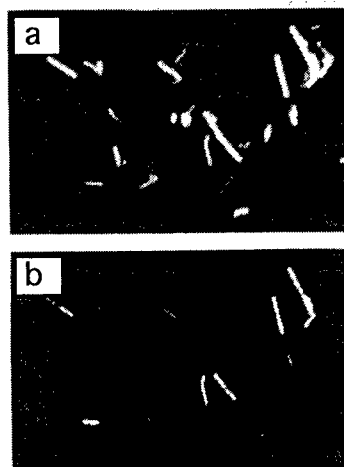


Fig. 1 Fluorescence micrographs of granular sludge (a) dyed with DAPI and (b) hybridized by Arch915 probe labeled with rhodamine.

キーワード：FISH法、DNAプローブ、UASBグラニューール、メタン生成活性、古細菌

〒940-21 新潟県長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学 水圏環境工学研究室 Tel：0258(46)6000 (内)6313

の割合を画像解析により求めた。なお全菌数は、微生物試料をフィルター上に集菌しDAPI染色により別途求めた。

2.3 生菌及び死滅菌の測定

UASBグラニュール内微生物のLive/Dead測定は、Molecular Probes社のL-7007 LIVE/DEAD kitを用いた。この kit で染色された細菌は、蛍光顕微鏡下で生菌は緑色、死滅菌は赤色の蛍光を発するため、画像解析により生菌割合を容易に算出することができる。

3. 実験結果及び考察

Fig.1 にFISH法による蛍光顕微鏡観察の一例（Sucrose基質で培養した高温グラニュール）を示す。2枚の写真は同一視野上のもので、(a)はDAPI、(b)はArch915プローブのテトラメチルローダミン蛍光であり、(b)で観察された細菌がArchaeaを示し、(a)の細菌で(b)には見られなかった菌が非Archaeaを意味する。従って、全菌数に対するArchaea数の割合を画像解析より算出できる。Fig.2に6種類の汚泥の全菌数に対するArchaea及び*Methanosaeta*の存在率を示した。Archaeaの存在率は、約40～60%の範囲であり、*Methanosaeta*の存在率は約20～40%の範囲にある。このことから、グラニュールは消化汚泥と同様に約半分がArchaeaで占められていることが分かる。ただし、Archaeaと*Methanosaeta*の存在率は容積負荷やメタン生成活性との明瞭な関係は見られず、基質は加水分解、酸生成、メタンへと転換されるため、基質組成に強く影響されると推測される。

Fig.3にVSS当りのArchaea数と全メタン生成活性の関係を示した。Archaea数と全メタン生成活性は正の関係が見られ、全メタン生成活性はArchaea量に依存することが分かる。また、VSS当りの*Methanosaeta*数と酢酸化メタン生成活性との関係をFig.4に示すように、*Methanosaeta*量もArchaeaと同様に酢酸化メタン生成活性に影響を及ぼすことが分かる。Fig.5はグラニュール内の生菌割合と基質容積負荷の関係を示している。基質高負荷ではグラニュール深部まで基質が浸透しやすくなると考えられるため、負荷が高いと生菌の割合が大きくなっている。

以上の結果より、グラニュール内の菌叢の構成比は基質組成に依存し、一方、メタン菌量はメタン生成活性と強い関係にあると考えられる。

4. おわりに

FISH法によってグラニュール内のArchaea及び*Methanosaeta*を評価することは可能であったが、グラニュールの生態学的構造や機能を解明するためには、*Methanobacterium*及び*Methanosarcina*等の定量も重要と考えられる。

5. 参考文献

- 1) Amann.R.I (1995): Molecular Microbial ecology Manual, 3.3.6. 1-15, Kluwer Academic Publishers.

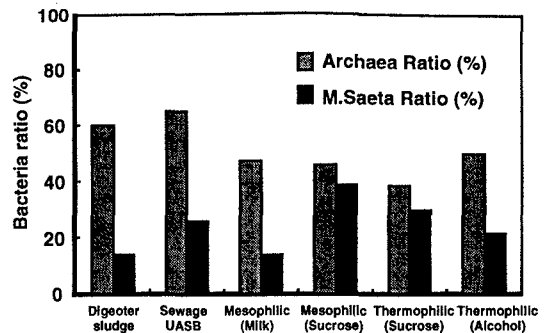


Fig.2 Archaea and M.saeta ratio on granular sludge.

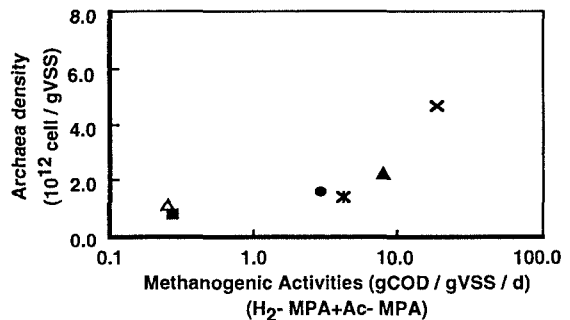


Fig.3 Relationship between Archaea density (Archaea cell number / VSS) and Methanogenic activities on granular sludge. Symbols are indicated in Table 1.

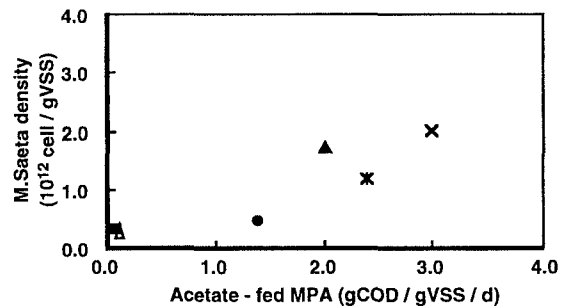


Fig.4 Relationship between M.saeta density (M.saeta cell number / VSS) and Methanogenic Activities on granular sludge. Symbols are indicated in Table 1.

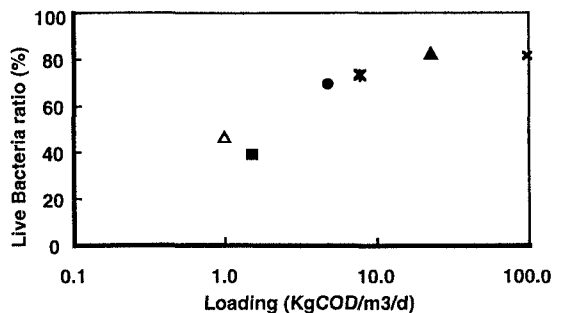


Fig.5 Relationship between Live Bacteria ratio and Loading. Symbols are indicated in Table 1.