

VII-12

FISHによる嫌気性グラニューール汚泥内の未知微生物の検出とその培養

長岡技術科学大学 ○関口勇地, 珠坪一晃, 大橋晶良, 原田秀樹

はじめに

UASB 反応槽内で見られる汚泥のグラニューール化は、本法の持つ高速処理性能を発揮する上で必須である重要な現象である。そのグラニューール内には、嫌気環境下での物質分解に関与する微生物群が高密度で存在し、その中で種々の微生物群が特徴ある生態系を形成している。現在まで、そのような嫌気環境下での物質分解に関与する微生物群の解明に多くの努力がはらわれてきたが、基本的な物質の嫌気的分解を担う微生物に関しては、未だ十分な理解に至っていないといえる。

我々は昨年度の本学会年次講演会において、有機性廃水の良好な処理能を示している中温(35°C)、及び高温(55°C)処理 UASB グラニューール内の微生物群衆構造を 16S rRNA 遺伝子に基づき解析を行った結果、多くの未知な微生物の存在が示唆されたことを報告した。そこで存在が示唆されたほとんどの微生物については、その生理的特性、グラニューール汚泥内での役割はおろか、その形態すらも不明である。

本研究では、グラニューール内で多く存在すると推定される未知な微生物群の生理的な特性、嫌気的有機物分解への役割を解明することを目的とし、培養法と、rDNA に関連した手法とを併用したアプローチを試みた。

実験方法

実験に用いたグラニューールは、sucrose, propionate, acetate が主成分である人工廃水を基質として用いた中温(35°C)、及び高温(55°C)UASB リアクターから採取した。両リアクターとも良好な有機物除去能およびメタン生成能を示しており(COD_{Cr}除去率が95%以上)、直径1-3mm程度のグラニューールを安定的に保持していた。

未知な微生物の検出のため、微生物群衆全体の rDNA の解析から得られた代表的な rDNA の配列から、それに特異的な DNA プローブを設計し、実際のグラニューールに FISH を適用した。その際、パラフィン包埋の後セクションを行ったグラニューール切片に対する FISH も同時に行うことで、ターゲット菌体のグラニューール内での空間分布を調査した。グラニューール切片に対する FISH では、CY5 でラベルしたプロローブと、TRITC でラベルしたプロローブによるハイブリダイゼーションを同一なサンプルに対して適用することで、2重染色を行った。

上記方法により得られた形態的な情報と、グラニューール内部での位置から予想される生理的特性から、各

グラニューールを植種源として通常のバッチによる集積培養を行い、ターゲットとした微生物の集積、分離を試みた。

結果と考察

中温及び高温グラニューールから、比較的高頻度で検出された rDNA クローン(高温グラニューールから比較的多く検出された green non-sulfur bacteria に属するクローン群(図-1)、中温グラニューールから高頻度で検出された *Proteobacteria* に属し、*Syntrophobacter wolinii* に近縁なクローン)に対して特異的な DNA プローブを設計した。

(1) Green non-sulfur bacteria に属するクローン群

まず、green non-sulfur bacteria に属するクローン群(図-1)の内、高温グラニューールのクローンライブラリ内で高頻度で検出されているクレードに着目した(高温グラニューールのクローンライブラリ内では16%の存在率、中温グラニューール内では2%)。このクレード内の rDNA クローンは、現在まで知られている細菌とは系統的に大きく離れており、その配列を持つ菌体に関しては全く知見がない。そこで、このクレードに特異的な塩基配列を元にプローブを作成した(GNSA633 probe; 5' TAGCCCGCCAGTCTTGAACG 3', 633-652 *E. coli* position)。本プローブは、現在まで知られている細菌の 16S rRNA とは4塩基以上のミスマッチを持つものであるが、ターゲットの配列には完全に相同なものである。そのプローブを用いて、高い stringency で分散状のグラニューール汚泥に FISH を適用したところ、高温グラニューールでフィラメント状の菌体を高い存在率で検出した。高い stringency 条件で、ほぼ同一の形態を持つ菌体を検出していたことから、おそらく本プローブはターゲットである菌体の特異的に検出していると考えられる。一方、中温グラニューールに対しても同様に本プローブを適用した結果、高温グラニューール汚泥で検出された菌体とほぼ同一の形態を持つ菌体が検出されたが、それは高温グラニューールから検出された菌体量に比べ非常にわずかであった。この結果は、rDNA クローンの解析結果と同様な傾向を示している。

次に、本プローブをグラニューール切片に対して適用したところ、高温グラニューールでは、その表層付近に存在するフィラメント状の菌体が蛍光を発していた(図-2)。以前より、特に高温グラニューールでは、その表面にフィラメント状の菌体が優先的に存在しグラニューール全体を覆っていることが報告されていたが、その細菌に関する知見は皆無であった。本結果は、その菌体の系統的位置を示唆するものである。一方、中温

嫌気性, UASB, グラニューール汚泥, FISH

長岡技術科学大学・環境システム工学系

(〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 TEL:0258-47-1611-6313 FAX:0258-47-9600)

グラニュールの切片に対しても同様に FISH を行ったが、得られたシグナルはごくわずかであった。中温グラニュール表面も、高温グラニュール表面の菌体と同様な形態を持つ細菌に覆われているが、この菌体は、本ブローブでは蛍光を発しなかった。従って、中温グラニュールのフィラメント状の菌体は、高温グラニュールのそれとは系統的に離れていることが推察された。

本プローブで検出された菌体は、そのグラニュール内での空間分布より、おそらく有機物の嫌気分解過程での初期の段階の基質である、人工廃水内の sucrose を発酵的に利用しているのではないかと予想された。そこで、sucrose を唯一のエネルギー源として、高温グラニュールから細菌の分離を試みた。その結果、通常のバッチによる集積培養では、形態的に上記プローブで検出された菌体とは大きく異なる細菌が優先的に増殖した。その分離株の 16S rDNA の塩基配列の一部を決定したところ、gram-positive bacteria の *Clostridium* のある株に非常に近縁 (98% の相同性) で、16S rDNA のクローニング解析では全く検出されていない細菌と同定され、グラニュール内で優先的に存在する菌体の培養は不可能であった。

(2) *Syntrophobacter* に近縁なクローン群

次に、中温グラニュール内で比較的高頻度で検出された *Syntrophobacter* に近縁なクローン群（中温グラニュールのクローンライブラリ内で約5%の存在率、高温グラニュールからは無検出）に着目した。*Syntrophobacter* に属する細菌は、中温の嫌気環境下でプロピオン酸を酸化し、酢酸と水素（もしくは乙酸）を生成する嫌気共生細菌であるが、グラニュールから検出されたクローンは、その細菌と塩基配列の相同性で95%程度を示しており、それに近い生理的特性を有していると予想された。本研究では、そのクローンの配列に対してのみ特異的なプローブを作成した（SYB701 probe; 5' AAATGCAGTTTCCAATGCAC 3', 701-720 *E. coli* position）。本プローブは、現在まで知られている細菌の16S rRNA とは3塩基以上のミスマッチを持つものである。またターゲットと近縁な *Syntrophobacter wolinii* に対しては、このプローブはハイブリダイズしないことを確かめている。そのプローブを用いて、高い stringency でグラニュール汚泥切片に FISH を適用したところ、中温グラニュールから、特にグラニュール内部で球状の菌体の特異的に、かつ高頻度で検出された（高温グラニュールからはシグナルは検出されなかった）。その検出された細菌は、グラニュール内部の深度の深い点で高頻度で存在することから、嫌気分解での最終的な中間生成物であるプロピオン酸などを利用していることが推察される。

そこで、中温グラニュールを植種源として、プロピオン酸を唯一のエネルギー源とした集積培養を試みたところ、プロピオン酸を酢酸とメタンに転換する集積培養系が得られた。6回の植え継ぎの後の集積培養系に本ブローブを適用したところ、グラニュール内で検出

された菌体と同様な形態を持つ菌体が集積系内で高い割合で検出された。この結果より、ターゲットとした *Syntrophobacter* に近縁な細菌は、プロピオン酸の酸化に寄与していることが確かめられた。

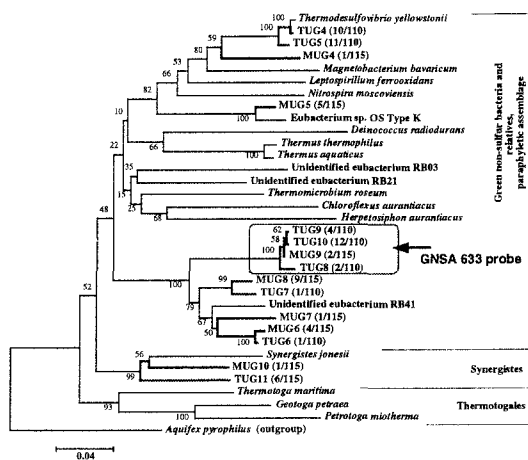


Fig.1 Phylogenetic tree of the clones among paraphyletic assemblage, green non sulfur bacteria and relatives, and the target of GNSA 633 probe, specific to a clade of clones within green non-sulfur bacteria. (MUG: clones detected from mesophilic granule clone library. TUG: clones detected from thermophilic granule clone library.)

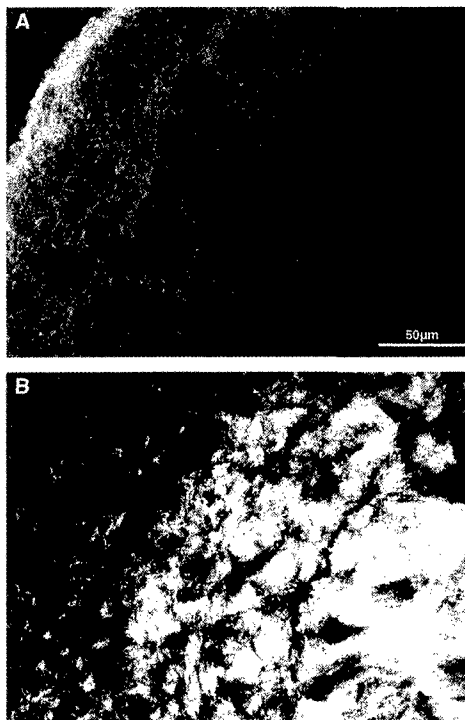


Fig.2 In situ hybridization of a cross-section of the thermophilic granular sludge. The section was hybridized with TRITC-labeled probe for clones in the green non-sulfur bacteria (probe GNSA633; A), and CY5-labeled probe for *Archaea* (probe ARC915; B) simultaneously.