

VII-61

高温嫌気性汚泥に対する16S rRNAアプローチで推定された新規細菌の分離と同定

長岡技術科学大学 ○関口勇地、大橋晶良、原田秀樹

はじめに

環境中の多くの微生物は人為的な培養、分離が困難であり、そのほとんどが未だに同定されていない。その状況は、嫌気環境下の微生物群集についても同様である。我々は、中温、高温処理UASB反応槽内のグラニュー汚泥を構成する微生物群集を16S rRNA遺伝子に基づき解析し、その中に多くの未だ同定されていない未知な微生物の存在を推定したり。それら微生物の多くについては、その解析で得られた16S rRNA遺伝子配列の情報以外全く分かっていない。しかし、そのような汚泥内に存在する16S rRNA遺伝子のライブラリは、各汚泥で重要な(すなわち優占している)微生物を分離する上で非常に有用な地図として利用できる。本研究では、先の16S rRNA遺伝子のクローニング解析で用いた汚泥を植種源としてさまざまな基質による微生物の培養、分離を行い、その中からクローニング解析で検出された配列を持つ微生物を選択した。その後、各分離株の生理学的諸特性を調査することによって、16S rRNA遺伝子のクローニング解析から重要と推定された微生物の汚泥内での役割を推定した。

実験方法

植種には、スクロース、酢酸、プロピオン酸が主成分である人工廃水を基質として用いた高温(55℃)UASB反応槽内のグラニュー汚泥を用いた。培養、分離に用いた培地は、Widdelら²⁾の方法に基づき調製した。集積培養には、各種有機物を基質として添加し、分散処理を施したグラニュー汚泥を植種後、55℃で培養した。また、分離した菌株の16S rDNAの解析は、細菌もしくは古細菌に特異的なプライマーセットで16S rRNA遺伝子をPCR増幅の後、直接塩基配列を決定した。

結果

集積培養のための基質にはさまざまな有機物を利用したが、その解析で分離され、かつ先の16S rRNA遺伝子のクローニング解析で検出された配列を持つ微生物

は、酢酸、酪酸、乳酸を基質とした系であった。

(1) 酢酸

酢酸を基質として集積培養を試みると、2週間程度で増殖が確認できた。2%植種による10回以上の継代培養の後においてもメタンの生成が見られ、顕微鏡観察では、*Methanosaeta*様のフィラメント状の微生物の増殖が見られた。Kanamycin等の抗生物質を添加した希釈培養を繰り返したが、しかし、その純粋培養には至らなかった。その集積培養系は、顕微鏡観察下ではほぼ純粋な系であったため、古細菌に特異的なプライマーセットで16S rRNA遺伝子をPCR増幅し、その塩基配列を決定したところ、現在知られている高温性メタン生成古細菌である*Methanosaeta thermophila* strain CALS-1と近縁であり(約96%の相同性)、先のクローニング解析で高頻度で得られたクローン(110クローン中19クローン)と相同な配列であった。この配列はクローニング解析で高頻度で得られたものであることから、この集積された微生物は高温汚泥内で高度に優占しているものであると推察された。この古細菌は、酢酸のみを利用してメタンを生成するものであり、高温グラニュー内での酢酸の消費とメタンの生成に関与しているものであると思われる。

(2) 酪酸

酪酸を基質として集積培養を試みると、1週間程度で増殖が確認できた。2%植種による10回以上の継代培養の後においてもメタンの生成が見られ、顕微鏡観察では常に2種類の形態を持つ微生物の存在が観察された。内1種類は、蛍光顕微鏡観察からメタン生成古細菌特有の自家蛍光が確認された。従って、この集積培養系は酪酸酸化を担う共生細菌とメタン生成古細菌との共生系であることが推察された。あらかじめ*Methanobacterium thermoautotrophicum*を添加した寒天希釈法で純粋な共生系を構築することを試みた後、酪酸酸化共生細菌のみを単独で培養できる基質を検索した結果、クロトン酸(10mM)で単独での培養、分離に成功した(TGB-C1株)。この分離株の16S rDNAを同

Keywords : 高温嫌気性処理、UASB法、共生細菌、16S rRNAアプローチ

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: 0258-46-6000 (6313) FAX: 0258-47-9600

定した結果、現在まで唯一知られている高温性の酪酸酸化共生細菌、*Thermosyntropha lipolytica* の16S rDNAと約90%の相同性を示し、先のクローニング解析で得られたクローン（110クローン中1クローン）と相同な配列であった。TGB-C1は、単独ではクロトン酸でのみ増殖し、メタン生成古細菌（*M. thermoautotrophicum*）との共生系ではイソ酪酸を含むC4-C10の飽和脂肪酸を利用した。

(3) 乳酸

酪酸の場合と同じく、乳酸（20mM）を基質とした集積培養を行った結果、F₄₂₀様の自家蛍光を発するメタン生成古細菌とビブリオ状の細菌の増殖が確認された。共生系が構築されていることが推察されたため、酪酸の場合と同様な分離操作を試み、次に同じく共生細菌が単独で利用できる基質を検索した。その結果、ビルビン酸（20mM）、乳酸+硫酸塩（各20mM）などでビブリオ状の共生細菌の単独での培養、分離に成功した（TGE-P1、TGL-LS1株）。本分離株は乳酸、水素などを硫酸塩存在下で利用できる高温性のグラム陰性硫酸還元細菌であり、16S rDNAを同定し系統推定を行った結果、同じく高温性のグラム陰性硫酸塩還元細菌である*Thermodesulfovibrio yellowstonii*に近縁であった（約96%の相同性）。また、これらの16S rDNAは、先のクローニング解析で高頻度で得られたクローン群（110クローン中19クローン）と相同な配列のものであった。従って、これらの株は高温汚泥内で高度に優占している可能性がある。TGE-P1、TGL-LS1株は、硫酸塩存在下で乳酸、水素、ギ酸を利用できるが、植種源である高温UASB反応槽に供給していた排水中には硫酸塩はほとんど入っていない事を考えると、これらの細菌は、汚泥内では硫酸呼吸ではない代謝を行っていると思われる。これらの株は、硫酸塩が存在しない場合、ビルビン酸で発酵的に生育できるだけでなく、メタン生成古細菌との共生系で乳酸を利用した。また、高温環境下では、糖などからの発酵産物として乳酸が多く生成することが知られている。これらの結果は、*Thermodesulfovibrio*属が、汚泥内で中間代謝産物として生成する乳酸の分解に大きな役割を果たしていることを示唆するものである。

参考文献

- 1) Sekiguchi et al. 1998, Microbiology 144, 2655-2665.
- 2) Widdel and Pfennig, 1989, Arch. Microbiol. 129, 395-400.



Fig.1 Electron micrograph of an ultrathin section of cells of strain TGB-C1. Growth was on crotonate medium at 55 °C. bar=0.5 µm.

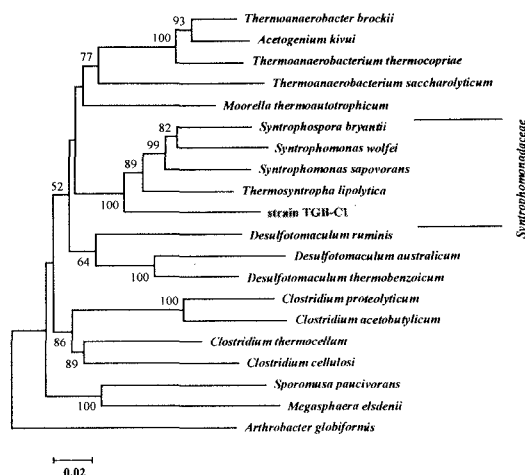


Fig.2 Phylogenetic tree of strain TGB-C1 and selected bacteria based on NJ analysis with 16S rDNAs.

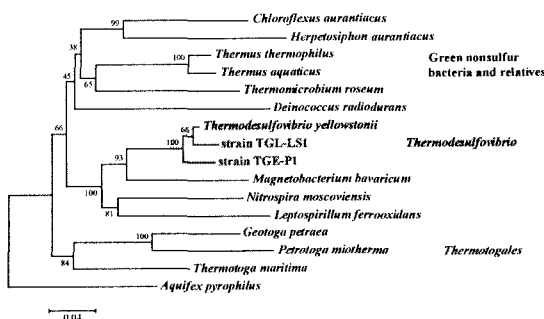


Fig.3 Phylogenetic tree of strain TGE-P1, TGL-LS1, and selected bacteria based on NJ analysis with 16S rDNAs.