

VII-62

高温嫌気性廃水処理におけるプロピオン酸酸化共生細菌の検索

長岡技術科学大学 学生会員 井町寛之、関口勇地
正会員 大橋晶良、原田秀樹

1. はじめに

UASB (upflow anaerobic sludge blanket) 法は主に中・高濃度有機性廃水の処理として用いられている嫌気性廃水処理技術である。現在、実用段階として運転されているUASBプロセスは中温域（30-40℃）もしくは無加温であるが、近年、さらに高負荷・高速処理が可能である高温（50-60℃）処理UASBプロセスが注目を集めている。高温UASBプロセスは、中温性の微生物より数段高い代謝活性を有する中度好熱性微生物を汚泥として活用するため、中温度域での処理よりも数段高い有機物負荷を許容することができる。しかしながら、現在その問題点として、揮発性脂肪酸、その中でも特にプロピオン酸が蓄積しやすいという報告がなされている。

プロピオン酸をはじめとする脂肪酸は、嫌気環境下で有機物分解の中間代謝産物として生成される。これら脂肪酸の分解は、脂肪酸を酸化し酢酸、水素およびCO₂などを生成する脂肪酸酸化細菌と生成した水素とCO₂から独立栄養的に生育する細菌（メタン生成古細菌や硫酸還元細菌など）が共に存在しないと進行しないことが知られている。このことから共生関係にあるプロピオン酸酸化細菌を単独で培養するのは非常に困難である。そのことを示すように、高温嫌気環境下でプロピオン酸の酸化分解反応を担う細菌は分離・同定されておらず、知見は全くないに等しいのが現状である（中温性では *Syntrophobacter* の3種のみ知られている）。

そこで本研究では、高温プロセスで問題となるプロピオン酸の蓄積に焦点を当て、その分解に関与する微生物の解析を行うことを目的とした。現在のところ、高温性の嫌気プロピオン酸酸化共生細菌の同定例は皆無であることから、高温UASBプロセスの汚泥を植種源として新たにその細菌を選択的に培養し、その分離と同定を試みた。

2. 実験方法

植種には、スクロース、酢酸、プロピオン酸を主成分とする人工廃水処理高温UASB反応槽（運転温度55℃）のグラニュール汚泥を用いた。本リアクターは、直径1-3mm程度のグラニュールを安定的に保持しており、良好な有機物除去能（COD_{Cr}除去率が95%以上）およびメタン生成能を示していた。分離・培養に用いた培地はWiddelら（1989）の方法に基づき調整した。集積培養には、人工培地にプロピオン酸を添加し、分散処理したグラニュール汚泥を植種後、55℃で培養した。

プロピオン酸酸化共生細菌の同定には、16S rRNA遺伝子を分子マーカーとする分子生物学的手法を用いた。集積培養液中の菌体からDNAを抽出し、PCRによって細菌由来の16S rRNA遺伝子のみを増幅した。その増幅産物を大腸菌を用いてクローン化し、ランダムに選択した10クローンについてHaeIIIを用いRFLP解析を行った。その結果、検出された断片長パターンに基づいてクローン化した16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。

3. 実験結果・考察

高温UASBグラニュール汚泥を植種源とし、プロピオン酸（20mM）を唯一のエネルギー源として集積培養を行うことによって、プロピオン酸酸化共生細菌の選択的培養を試みた。その集積培養系は非常に増殖が遅く、約1カ月で微生物の増殖がみられた。その後、集積培養液を1%植種し継代培養を10回程度行った。その集積培養系を顕微鏡で観察すると、F₄₂₀様の自家蛍光を持つ桿菌と数種類の微生物を含んでいた（Fig.1）。また、プロピオン酸の分解に伴いメタンが生成されていることから、中温度域で報告されている *Syntrophobacter* 属細菌と同様の代謝特性を持つ共生細菌と *Methanobacterium* 様のメタン生成古細菌との共生系が構築されていることが推察できた。そこで、この共生細菌と *Methanobacterium*

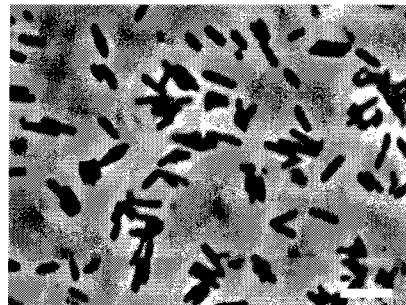


Fig. 1 Phase contrast micrograph of propionate-enrichment culture after 10 times of successive transfer (bar=5μm).

高温UASBプロセス、グラニュール汚泥、共生、プロピオン酸酸化細菌、*Desulfotomaculum*

長岡技術科学大学・環境建設系 水圏環境制御工学研究室

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

thermoautrophicum ΔHとの純粋な共生系の構築を試みたが、ロールチューブ法によるコロニーの形成は不可能であり、この共生細菌の分離は困難であった。

そこで、培養に依らずプロピオン酸酸化を担う細菌を同定するため、16S rRNA遺伝子を分子マーカーとして利用した。10回継代培養後の集積培養液から抽出したDNAをテンプレートとして、細菌由来の16S rRNA遺伝子を増幅し、大腸菌でクローン化した。その後、得られたクローンのうち10クローンについて、*Hae* IIIを用いてRFLP解析を行った。その結果、4種類の電気泳動パターンを検出した。そこで、それぞれの16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。その結果をFig.2に示す。4種類のクローンのうち最も高頻度で検出されたクローン（10クローン中7クローン; TGP-1）ともう1つのクローン（10クローン中1クローン; TGP-2）が*Desulfotomaculum*属に近縁であることが解った（他の2種類のクローン（TGP3とTGP4）は、本集積培養系からyeast extractで分離した細菌と同じ塩基配列を持つもので、この細菌はプロピオン酸を共生系で利用できないことを確認している）。*Desulfotomaculum*属は孢子形成能をもつ硫酸還元細菌で、主に高温性の細菌によって構成されているものである。また、これらのクローンが最も近縁であった propionate-oxidizing spore former Aとpropionate-oxidizing spore former Bとは、現在、新規の中温性嫌気プロピオン酸酸化共生細菌として培養されているもので、未だに純粋には分離されていないものである（Harmsen, 1996）。

このクローン群（TGP1とTGP2）が多く検出されたことから、集積培養系内でこのクローンと同じ塩基配列を持つ細菌が多く存在している可能性がある。実際に集積培養系内を顕微鏡で観察すると、これらのクローンに近縁である*Desulfotomaculum*様の孢子形成能を持つ細菌が確認できる。このことから、クローンTGP1とクローンTGP2の塩基配列を持つものがプロピオン酸酸化共生細菌であろうと推察された。また、この系統解析の結果は、本細菌が共生に依らず、硫酸還元により単独でプロピオン酸を酸化できる可能性があることを示唆している。

4.おわりに

今のところ、クローンTGP1とクローンTGP2の塩基配列を持つものがプロピオン酸酸化共生細菌であるかは定かではない。そこで、*Desulfotomaculum*属の細菌が利用できる基質を用いて、現在、その細菌の分離を試みているところである（Table.1）。

今後の予定として、得られた16S rRNA遺伝子配列をもとに、それに特異的なDNAプローブを作成し、集積培養系内に多く存在する細菌を確かに検出できるかを検証する。また、植種源である高温グラニュールにもそのプローブを適用し、菌数の測定やグラニュールでの空間的な位置の把握をする予定である。

参考文献

- 1) Widdle and Pfennig. (1989). Arch. Microbiol. 129, 395-400.
- 2) Harmsen, H. J. M. (1996). Detection, Phylogeny and population Dynamics of Syntrophic Propionate Oxidizing Bacteria in Anaerobic Granular Sludge. Ph. D. Thesis, Wageningen Agriculture University.

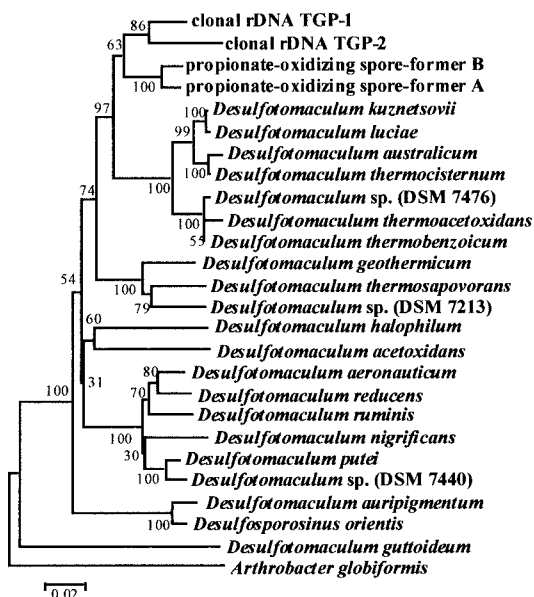


Fig.2 Phylogenetic dendrogram among the genus *Desulfotomaculum* in *Clostridium*/*Bacillus* subclass of the Gram positive bacteria, showing the phylogenetic position of the clones recovered.

Table.1 Substrates tested for isolation of propionate-oxidizing syntrophic bacteria.

Substrate	conc.(mM)
lactate/sulfate	20
ethanol/sulfate	20
propionate/sulfate	20
pyruvate	10
yeast extract	0.1%
propionate	20
H ₂ /sulfate	1atm
H ₂ /sulfate+chroloform	1atm
formate/sulfate+chroloform	20
fructose/sulfate	20
1-propanol/sulfate	20
fumarate/sulfate	20
malate/sulfate	20
methanol/sulfate	20
benzoate/sulfate	5
butyrate/sulfate	20
sucrose	20

concentration; sulfate is 20mM, chroloform is 1%.