

# 高温条件へのシフトアップによるグラニューール内の微生物構造の変化

長岡高専 正 荒木 信夫\*、岩野 安寿香、長谷川 航  
長岡技科大 学 多川 正、正 原田 秀樹

## 1. はじめに

高温UASB法は中温に比較して数倍のメタン生成ポテンシャルを有しているが長期のスタートアップ期間が必要であったり、UASBの決め手となるグラニューールがなかなか形成しないといった問題が報告されている。これまでの研究により中温UASBで形成したグラニューール汚泥を植種すると比較的容易にスタートアップできることが判明した。しかし、中温グラニューール中に高温メタン菌種が存在しているのか、また、グラニューール内でどのように中温菌種から高温菌種に優占種が変遷していくかについての情報は全く得られていない。本研究は、中温条件から高温条件にシフトした場合のグラニューール内の微生物構造の変遷を遺伝子プローブ法を用いて追跡したものである。

## 2. 実験方法

35 から 55 への温度シフトアップ実験はラボスケールのUASBと3000mg-COD/Lの人工廃水( シュクロース：酢酸：プロピオン酸：ペプトン=1350：675：675：300mg-COD/L )を用いて行った。種汚泥はジュース廃水を用いて35 のUASBで形成したグラニューールを用いた。グラニューールはあらかじめ人工廃水を用いて約1年間にわたって10kg-COD/m<sup>3</sup>/d、35 で培養し、その後UASBの温度を55 に上昇した。温度上昇後の負荷は、1-8日目：3kg、9-17日目：1.6kg、18-24日目：3kg、25-42日目：6kg、43日目以降：10 kg-COD /m<sup>3</sup>/dと変化させた。

温度上昇後、定期的にグラニューールを採取し、遺伝子プローブのFISH法を用いて微生物構造の解析を行った。FISH解析に用いたプローブ及び適用条件は表-1のとおりである。採取したグラニューールは超音波によって分散処理を行った後、パラフォルムアルデヒドで固定し、プローブをハイブリダイズした。各プローブで検出した細胞の存在率は同じ視野で検出されるDAPI染色細胞との比とした。また、グラニューールをパラフィン包埋後に切片を作成し、プローブ検出菌種のグラニューール内での空間分布を観察した。

表-1 解析に用いたプローブと適用条件

Probe	Specificity	Probe sequence(5'-3')	Target Site	°C*	% FA
ARC915	Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	915-934	46	20
EUB338	Eubacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	335-355	46	20
MX825	<i>Methanosaeta</i>	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC	847-825	46	20
MB1174	<i>Methanobacteriaceae</i>	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	1195-1174	46	20
TMX745	Thermophilic <i>Methanosaeta</i>	CCCTTGCCGTCGGATCCG	745-762	46	35
MMX1273	Mesophilic <i>Methanosaeta</i>	TTTTAGGAGATTCCCGTC	1273-1290	46	10

\*: Hybridization Temperature. FA: Formamide concentration in hybridization buffer.

## 3. 実験結果

図-1に55 に温度上昇してからの単位汚泥重当たりのDAPI染色細胞の変化を示す。グラニューール汚泥内の細胞数は温度上昇後  $1.5 \times 10^{12}$  から  $3.5 \times 10^{11}$  cells/g-VSSまで急激に低下した。これは温度上昇によって中温性細菌が死滅し、溶菌したものと考えられる。図-2は古細菌を検出するARC915と全バクテリアを検出するEUB338で検出した細菌のDAPI染色細胞に対する割合の変化を示したものである。この両プローブで検出される細胞の割合は0日目(35 条件)では95%であったものが、3日目には79%、20日目には43%にまで低下し、56日目でさえも52%までにしか回復しなかった。両プローブで検出されないUnknownの部分は細胞内にDNAは保存されている(DAPIで染色される)ものの、プローブのターゲットとなる16SrRNAが少ない(活性が消失し

キーワード：嫌気性処理、高温メタン生成細菌、DNAプローブ、グラニューール汚泥

\* 〒940-8532 長岡市西片貝町888 Tel:0258-34-9281 Fax:0258-34-9284 E-mail:araki@nagaoka-ct.ac.jp

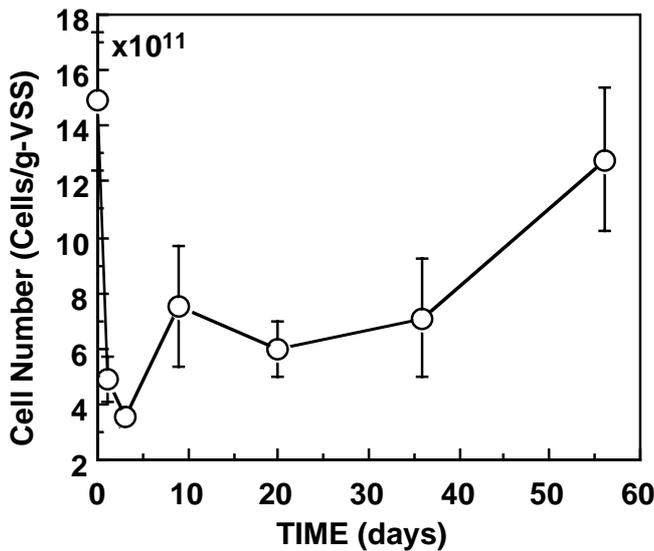


図-1 単位汚泥重当たりの DAPI 染色細胞数の変化

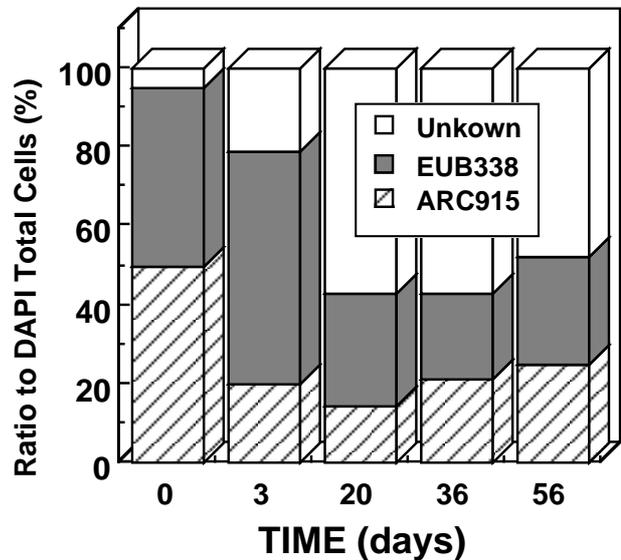


図-2 DAPI 染色細胞に対する EUB338 および ARC915 検出細胞の割合の変化

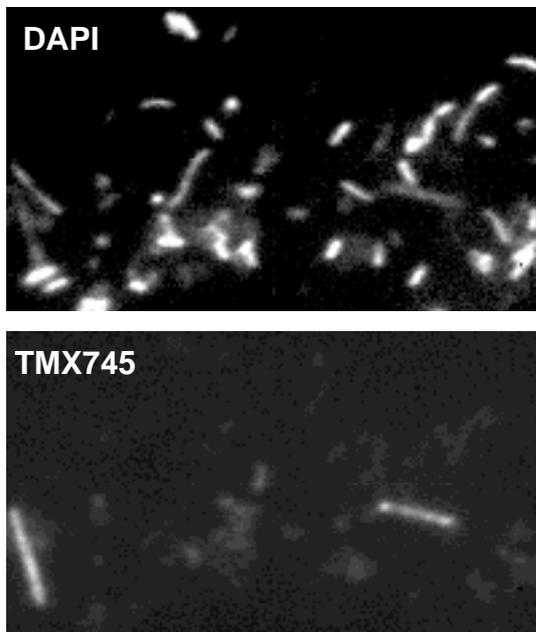


図-4 Day0(35 )グラニューールで検出された高温種 *Methanosaeta* 属

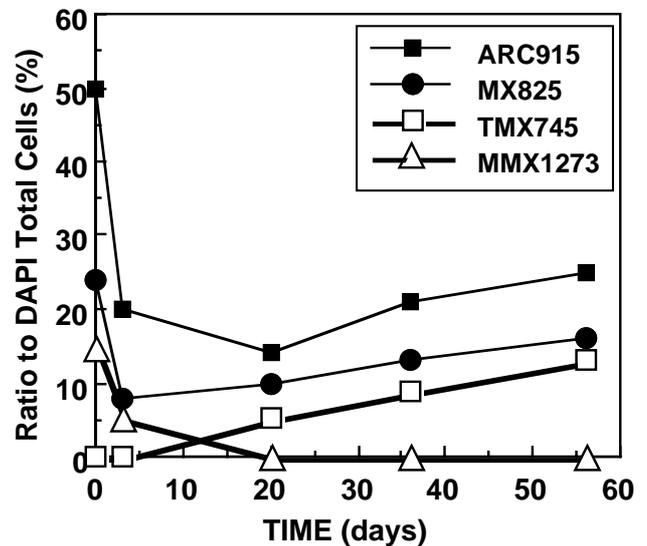


図-3 DAPI 染色細胞に対する ARC915、Mx825、TMX745 および MMX1273 検出細胞の割合の変化

た)細胞であると考えられる。温度変化は中温性細菌の消失を招くが、多くの細胞が長期にわたって失活状態でグラニューール内に残存することが明らかになった。

図-3は DAPI 染色細胞に対する全メタン菌(ARC915)、*Methanosaeta* 属(MX825)、高温種 *Methanosaeta* 属(TMx745)及び中温種 *Methanosaeta* 属(MMX1273)の存在率の変化である。グラニューール内のメタン生成細菌は、その約 1/2 がプローブ MX825 で検出される *Methanosaeta* 属が占めていた。中温種 *Methanosaeta* 属は温度上昇後約 3 週間で完全に失活しプローブで検出されなくなった。高温種 *Methanosaeta* 属は全く高温条件を経験していない 0 日目のグラニューールにも僅かに存在が確認された(図-4)。高温条件へシフトアップ後、この僅かな高温種 *Methanosaeta* 属が増殖し、中温種 *Methanosaeta* 属に代わってグラニューール内で優先したものと推測される。高温種性 *Methanosaeta* の存在率は約 3 週間の運転で 5.4% にまで上昇するものであった。

0 日目グラニューール切片の FISH 解析では、表層では主に EUB338 で検出される細胞、内部では *Methanosaeta* 属のコロニーが集積した 2 重構造を呈していた。高温条件へのシフトアップ後 56 日目には、グラニューール内部のほとんどがプローブおよび DAPI でも染色されない失活した細胞で占められており、表層部分にだけ高温種 *Methanosaeta* 属が増殖していることが観察された。