

新規高温性絶対嫌気プロピオン酸酸化共生細菌の生理と生態

－嫌気性グラニュール汚泥内における高温性プロピオン酸酸化共生細菌の空間的分布－

長岡技術科学大学 学生会員 井町寛之
正会員 関口勇地、大橋晶良、原田秀樹

はじめに

現在、UASB (upflow anaerobic sludge blanket) プロセスは食品加工系などの中・高濃度有機性廃水処理において広く普及し、成功を収めている。これら実機で稼働しているすべてのUASB プロセスは中温域 (35℃ 付近) あるいは無加温で運転されている。近年、中温 UASB プロセスよりもさらに高負荷・高速処理が可能である高温 (55℃ 付近) UASB プロセスが、次世代型の嫌気性廃水処理技術として開発が進められている。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使用するため、中温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技術である。しかしながら、高温プロセスは中温プロセスに比べて環境変動に弱く、維持管理が困難であるという理由から、実用化には至っていない。この高温プロセスの実用化にはいくつかクリアしなければならない問題があるが、その中でも特に大きな問題は、その運転が不安定になった際にプロピオン酸がシステム内に蓄積し、良好な処理が望めなくなってしまうことにある。このプロピオン酸の蓄積は多くの研究者達によって報告はなされているが、その問題を解決する有効な解決法は未だ不明である。そこで本研究では、このプロピオン酸の蓄積問題を解決する手がかりとして、まずプロピオン酸の分解を担う微生物の分離と同定を行い、その後、その生理学的な特徴を把握することにより高温嫌気性廃水処理の運転指針を提案することを最終目的に掲げた。我々は昨年度の本学会年次講演会において、高温 UASB グラニュール汚泥からメタン生成古細菌との共生によりプロピオン酸の酸化分解を行う共生細菌 SI 株を分離したことは報告した。しかしながら、その詳しい生理学的な特徴やグラニュール汚泥内での生態は全く不明であった。そこで、今回は分離株 SI の菌学的な特徴の把握と FISH 法を用いたグラニュール汚泥内における分離株の空間的分布の解明を行ったので報告する。

実験方法

分離株 SI の培養に用いた人工培地は Widdel ら (Widdel & Pfennig, 1981) に従った。SI 株のグラニュール汚泥内の空間分布の調査には分離源と同じスクロース、プロピオン酸と酢酸を主な炭素源とする人工廃水を通水した中温 (35℃) および高温 (55℃) UASB グラニュール汚泥を用いた。両リアクターともに COD 除去率で 95% 以上と高い有機物除去能と良好なメタン生成能を示しており、直径 1-3mm 程度のグラニュール汚泥を安定的に保持していた。そのグラニュール汚泥を固定、凍結融解 (5 回)、パラフィン包埋した後、マイクロトームにより 10 ~ 15µm の厚さに薄切した。その切片はキシレン、エタノールで脱パラフィンを行った後、実験に供した。FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法は Amann ら (Amann *et al.*, 1995) の方法に準じて行った。分離株の検出には DNA プロブ TGP690 (5'-CTCAAGTCCCTCAGTTTCAA-3', 690-709 *Escherichia coli* position) を用いた。グラニュール切片に対する 2 重染色は DNA プロブ TGP690 に rhodamine を、*Methanobacteriaceae* に特異的なプロブ MB1174 (Raskin *et al.*, 1994) には Cy-5 と異なる蛍光標識を付加して行った。

実験結果・考察

高温 UASB グラニュール汚泥を植種源としたプロピオン酸による集積培養を行い、この集積系内に存在したプロピオン酸酸化共生細菌を分子生物学的手法を活用しながら分離を試みた。その結果、エタノールにより *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH との純粋な共生系で、ピルビン酸によって単独にプロピオン酸酸化共生細菌 SI 株を分離したことは昨年度の本学会年次講演会において報告した。この分離には、プロピオン酸集積培養系内細菌のクローン解析から最も高頻度に検出されたクローンの配列をもとに作成した DNA プロブ TGP690 をスクリーニングのツールとして用いることにより、最終的に本共生細菌を分離することに成功した (Fig. 1)。



Fig. 1 Phase contrast micrograph of strain SI grown on pyruvate (10 mM). Bar represents 10µm.

Keywords: 高温 UASB プロセス、グラニュール汚泥、プロピオン酸酸化共生細菌、FISH 法
長岡技術科学大学 環境・建設系 水圏土壌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-ext.6313 FAX: 0258-47-9600

分離株 SI の生理学的な特徴

分離株 SI の生理学的な特徴をいくつか調査したので以下に記載する。SI 株はグラム染色反応陰性で運動性のない桿菌であり、その細胞のサイズはピルビン酸で生育した場合、長さは 1.7-2.8 μm で幅は 0.7-0.8 μm であった。SI 株はプロピオン酸以外にエタノールあるいは乳酸を *M. thermoautotrophicum* ΔH との共生で利用でき、ピルビン酸で単独に生育できる。SI 株の生育には yeast extract を要求した。16S rDNA を基にした分子系統解析によると *Desulfotomaculum* 属に属する新規の細菌であった。その比増殖速度はプロピオン酸を基質とし *M. thermoautotrophicum* ΔH との純粋な共生系、あるいはこれに *Methanosaeta thermophila* を加えた 3 者培養系ともに 0.19/day ($t_d=5.4\text{day}$) であった。また、エタノールを基質とした *M. thermoautotrophicum* ΔH との共生系の場合には 2.4/day ($t_d=10\text{hr}$) であった。孢子形成はプロピオン酸を基質として培養し、*M. thermoautotrophicum* ΔH と *M. thermophila* との 3 者培養系でのみ観察され、この系内ではプロピオン酸を完全にメタンに転換した。硫酸塩存在下で、SI 株は硫酸還元を伴い、プロピオン酸、エタノールと乳酸で生育はできるが *M. thermoautotrophicum* ΔH との共生によるこれらの基質の分解よりもその生育は遅かった。特に、硫酸還元を伴ったプロピオン酸での生育は非常に遅かった。

FISH 法によるグラニүүл汚泥内のプロピオン酸酸化共生細菌の検出と空間分布の解明

分離株 SI に特異的な DNA プローブ TGP690 を用いて FISH 法を行うことによりグラニүүл汚泥内の高温性プロピオン酸酸化共生細菌の存在とその空間的な分布の解明を試みた。グラニүүл切片に対し、DNA プローブ TGP690 と *Methanobacteriaceae* に特異的なプローブ MB1174 による 2 重染色を行った。その結果、中温グラニүүл汚泥では全く TGP690 プローブによるシグナルは検出されなかったが、高温グラニүүл汚泥内には TGP690 プローブに反応する桿菌がグラニүүл汚泥内に広く存在し、かつ MB1174 プローブで検出された *Methanobacterium* 様の古細菌とお互いに非常に密接した集塊体を形成していた (Fig. 2)。

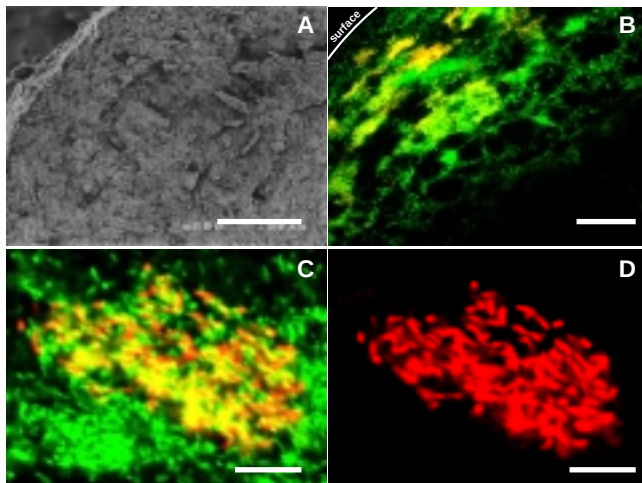


Fig. 2 Scanning electron micrograph and *in situ* hybridization of sections from thermophilic granules viewed by CLSM. (A) a scanning electron micrograph of a section of a thermophilic sludge granule (bar represents 150 μm), (B) a section hybridized with rhodamine-labeled TGP690 probe (red) and Cy-5-labeled *Methanobacteriaceae*-specific probe MB1174 (green) (bar represents 50 μm). (C & D) higher magnification of a microcolony of strain SI and *Methanobacterium*-like cells: (C) double staining with TGP690 and MB1174 probes, (D) only signals from TGP690 probe from the same view as panel (C) (bar represents 10 μm).

このことから TGP690 プローブで検出される細菌が水素を放出しながら基質を酸化分解していると考えられる。Stamsらはプロピオン酸からメタンへの反応が進行するための自由エネルギー変化や生物膜内での水素の拡散速度などを考慮すると、プロピオン酸酸化細菌と水素資化性のメタン生成古細菌との物理的距離はおおよそ 1 μm 以下保たれている必要があると報告しており (Stams *et al.*, 1989)、この結果はこの条件を十分に満たしているものであった。このことから、分離株 SI は汚泥内で種間水素伝達による共生系を構築しながらプロピオン酸の酸化分解を担っていることが示唆された。また、SI 株はプロピオン酸以外にエタノールと乳酸をメタン生成古細菌との共生によって利用できることから、これらの中間代謝産物の分解にも関与しているのかも知れない。以上のことから、分離株 SI はグラニүүл汚泥内で非常に重要な役割を担っていることが示唆された。

参考文献

- Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Raskin, L., J. M. Stromley, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1232-1240.
- Stams, A. J. M., J. T. C. Grotenhuis, and A. J. B. Zhender. 1989. *Recent Advances in Microbial Ecology*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 440-445.
- Widdel, F., and N. Pfennig. 1981. *Arch. Microbiol.* **129**:395-400.
- 井町寛之ら 1999. 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. 土木学会第 54 回年次学術講演会講演概要集 第 7 部, 124-125.