嫌気性消化汚泥中に存在するメタン生成古細菌群に関する調査

長岡技術科学大学　学生会員　牧敬子
正会員　原田秀樹、大橋晶良、関口勇地

1．実験目的

下水処理過程において発生する余剰汚泥の一部は、現在嫌気的処理によって消化、減容化がなされている。近年、長岡市などでは消化過程で発生する消化ガスの有効利用化が進められている。昨今の様々な環境問題、資源問題を鑑みても、今後は一層積極的にこのような資源を有効に利用していく必要があると考えられる。消化ガスの有効利用を進めるためには、いかにそれを低コストで精製し都市ガスとして利用可能なものにするか、いかに高収率で消化ガスを回収するかなど、様々な面での技術革新が必要である。本研究では単位下水汚泥当たりの消化ガス生成効率の向上を目的とし、これを左右しうる要素の 1 つである消化汚泥内の微生物群集構造に着目し、まず各種汚泥のメタン収率とその微生物群集構造の間に何らかの関係を見出すことを試みた。その足がかりとして、今回は各種消化汚泥内のメタン生成古細菌群の同定と定量を行うための基礎的検討を行った。

2．実験方法

2‐1．使用した消化汚泥サンプル

本研究では 3 サンプルについて実験を行った。使用したサンプルは下水処理場の実下水中温消化汚泥である。サンプルは採取後直ちに基質洗浄を行い、使用するまで -80(℃)に保存した。また一部は FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)法を行うためにパラホルムアルデヒドを用いて固定操作を行い、-20(℃)に保存した。

2‐2．消化汚泥中のメタン生成古細菌の同定法

消化汚泥中のメタン生成古細菌の同定には 16S rRNA 遺伝子(以下 16S rDNA)を分子マーカとする手法を利用した。消化汚泥から DNA を抽出し古細菌由来の 16S rDNA を PCR 増幅後、クローン化し、ランダムに選んだクローンについて 2 種類の制限酵素を利用した RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）解析を行った。その後、各パターンを代表するクローンについて、その塩基配列を決定した。

2‐2．消化汚泥中のメタン生成古細菌群の定量

消化汚泥中のメタン生成古細菌の定量には、FISH 法によるカウントと同時に、抽出した RNA によるメンブレンハイブリダイゼーション法を適用した。はじめにターゲットであるメタン生成古細菌群の 16S rRNA を人工的に in vitro で合成する系を確立した。今回 16S rRNA の合成系を確立したのは *M.bryantii*(DSM863)、*M.thermoautotrophicus*(⊿H)、*M.thermophila*(DSM6194)、*M.concilii*(DSM3671)、*M.hungatei*(DSM864)、*M.limicola* の 6 種類である。まず RNA 合成時の鋳型となる DNA を得るためにメタン生成古細菌の純粋培養系から抽出した DNA 中の 16S rDNA 部位のほぼ全長を PCR 増幅し、これを T7 プロモーター配列を含むプラスミドに組み込んだ。これを大腸菌によってクローン化し、そのプラスミドから再び 16S rDNA 部位を PCR 増幅した産物を鋳型とし、RNA ポリメラーゼを用いて各 RNA を合成した。プローブは DIG(ジゴキシゲニン)標識施した 16S rRNA 標的プローブを使用した。この DIG に結合する AP(アルカリホスフォターゼ)に化学蛍光キット(ECF Signal Amplification Modele,Amersham)を用いてシグナルの検出を行った(Fig.1)。抽出した RNA サンプル、及び合成 RNA はナイロンメンブレン上に定量を行う目的でスロット状にブロッティングした。ECF による各スロットの蛍光強度の測定は蛍光イメジャー(Molecular Imager FX,BIO-RAD)で検出し、画像解析ソフト Quantity One(BIO-RAD)で数値化した。

3．実験結果

3‐1．消化汚泥中のメタン生成古細菌の同定

はじめに 3 種類の消化汚泥中の古細菌由来の 16S rDNA のクローンライブラリを構築し、そこで検出された配列を基

キーワード/消化汚泥、メタン生成古細菌群、16S rRNA、メブレンハイブリダイゼーション法
連　絡　先/〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 環境建設系
Tel.0258-46-6000(6646)　Fax.0258-47-9600

に消化汚泥内のメタン生成古細菌の同定を試みた。クローン化した 16S rDNA からサンプル 1：29 クローン、サンプル 2：21 クローン、サンプル 3：27 クローンをそれぞれランダムに選択し、*Hae*III、*Hha* I、*Msp* I の制限酵素のうち 2 種類を用いてパターン化したところ、サンプル 1 は 7 種(Fig.1)、サンプル 2 は 4 種、サンプル 3 は 2 種の RFLP パターンが確認された。各パターンを持つクローンについてその塩基配列を決定したところ、サンプル 1 は最も高頻度(検出頻度：20/29 クローン)で検出されたパターンが *Methanosaeta concilii* の 16S rDNA に極めて高い相同性(98(%)程度)を示し、その他にも *M.concilii* の 16S rDNA に相同性が高いクローンが 3 パターン(Clone D,E,F)存在した(相同性は 96～99(%))。サンプル 1 の解析結果、29 クローン中 23 クローンが *Methanosaeta* に近縁な古細菌に由来するものであることが推定された。一方、29クローン中4クローンが示したclone B および 1 クローン検出された clone C は *Methanospirillum hungatei* に近縁な古細菌に由来するものと推定された。サンプル 2 を解析した結果、最も高頻度(検出頻度：15/21 クローン)で検出されたクローンは *Methanosarcina barkeri* の 16S rDNA に高い相同性を示した(96～97(%))。他に *Methanospirillum* に近縁な種に由来すると考えられるクローンが 5 クローン、*Methanosarcina* に近縁な種に由来するものと考えられるクローンが 1 クローン検出された。サンプル 3 を解析した結果、クローンのほぼ全て(検出頻度：26/27 クローン)が *Methanoculleus palmaeoli* の 16S rDNA に高い相同生を示すものであった。

以上の結果、消化汚泥を構成する古細菌群はほぼ全てがメタン生成古細菌であり、その構成は消化汚泥の種類によって全く異なるものの、比較的シンプルなものであることが判明した。

3‐2．消化汚泥中のメタン生成古細菌の定量

消化汚泥中のメタン生成古細菌の菌大量を推定するために、まず FISH 法によるカウントを試みた。しかしながら、メタン生成古細菌に由来するプローブの蛍光は極めて弱いことに加え、自家蛍光を有する様々な物質(無機物、etc.)に阻害され、その正確なカウントを行うことはほとんど不可能であった。そのため次に消化汚泥から抽出した RNA を直接用いるメンブレンハイブリダイゼーションを利用し、その定量を試みた。一般にメタン生成古細菌群は増殖速度が遅く、菌体収率も低いことから、純粋培養系から一定量の標準 16S rRNA を確保するのは極めて困難である。そこで今回は各種メタン生成古細菌の標準 16SrRNA を RNA ポリメラーゼを用いて in vitro で人工的に合成する系を確立した。ここで合成したRNAが各メタン生成古細菌の 16S rRNAを代表しているかどうかの確認は、合成した RNA を標的とした DIG 標識各種メタン生成古細菌用プローブによるメンブレンハイブリダイゼーションによって確認した(Fig.2)。この系を利用し、UNIV1392 プローブで検出されたシグナルに対する古細菌由来のシグナルを ARC915 プローブで、また各メタン生成古細菌群に由来するシグナルを MB1174、MX825、MG1200 プローブによって検出した。その結果、サンプル 1 では全 SSU rRNA 中の 8.7(%)が古細菌に由来していることが推定され、そのほとんどが *Methanosaetaceae* に由来するものであった。サンプル 2 では全 SSU rRNA 中の 9.6(%)が古細菌に由来していることが推定された。サンプル 3 では全 SSU rRNA 中の 2.4(%)が古細菌に由来していることが推定され、そのほとんどが *Methanocorpusculaceae,Methanomicrobiuaceae, Methanoplanaceae* に由来するものであった。

以上の結果はメタン生成古細菌の同定結果と一致するものであった。今後消化汚泥内のメタン生成古細菌の構成を詳しく解析すると共に、さらにいくつかの消化汚泥内の調査を行う予定である。

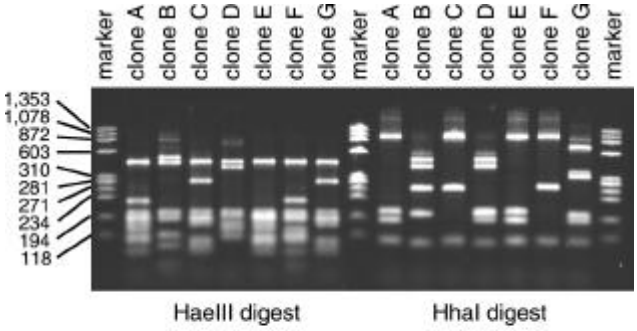

Fig.1 Restriction fragment length polymorphism analysis for archaeal 16S rDNA clone recovered from anaerobic sewage sludge(Sample No.1). Lane 1,9,17:marker DNA, Lane 2-8: representative clones digested with *Hae Ⅲ*. Lane 10-16: representative clones digested with *Hha Ⅰ*

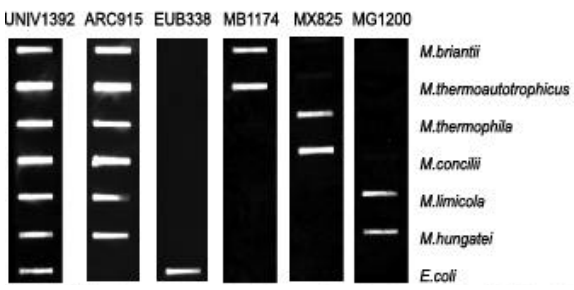

Fig.2 Hybridization responses of methanogenic probes to nucleic acids. From 6 target of methanogens and 1 target of the domain *Bacteria*. Each nucleic acid was applied to the nylon membranes.